



UNIVERSITÉ DE
SHERBROOKE

Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé

Département de Médecine Nucléaire et Radiobiologie

**Modélisation pharmacocinétique de la réponse tumorale à la thérapie
photodynamique simultanément avec l'imagerie TEP**

Mémoire par articles présenté en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

Rédigé par **Paté Boubacar**

Évaluateurs:

Dr M'hamed Bentourkia, Directeur de recherche, Université de Sherbrooke, Canada
Dr Roger Lecomte, Directeur de recherche, Université de Sherbrooke, Canada
Dr Martin Lepage, Membre interne, Université de Sherbrooke, Canada
Dr Layachi Bentabet, membre externe, Université de Bishop's, Canada

Décembre 2008



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-53379-6
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-53379-6

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail consiste à étudier la réponse tumorale à la thérapie photodynamique (TPD), notamment en examinant les mécanismes d'action de 2 photosensibilisateurs utilisés pour cette TPD, à savoir l'Aluminium phtalocyanine tétrasulfonée (AlPcS₄), et le Zinc phtalocyanine disulfonée (ZnPcS₂). L'étude aborde le problème à travers la modélisation pharmacocinétique décrivant la captation tumorale du [18F]-fluorodésoxyglucose durant la thérapie photodynamique sur les tumeurs, avec comme objectif de mettre en évidence les phénomènes métaboliques transitoires durant le traitement.

La tomographie d'émission par positons, qui est un outil d'imagerie puissant et non invasif permettant d'étudier *in vivo* les processus biologiques et moléculaires au niveau oncologique, a été combinée à la TPD pour l'évaluation en temps réel de la réponse tumorale. Des travaux antérieurs, mis en œuvre à travers un protocole qui comporte deux tumeurs dont l'une sera traitée tandis que l'autre a servi de contrôle, ont mis en évidence le potentiel énorme de cette combinaison. En effet, la faisabilité d'utiliser l'imagerie TEP en temps réel avec des infusions continues de FDG a été démontrée afin d'étudier la réponse métabolique tumorale durant la thérapie photodynamique chez un modèle de rongeur. La pertinence de la méthode a notamment été mise en évidence dans l'étude des changements métaboliques transitoires survenant aux niveaux tumoral et systémique pendant et tout de suite après la TPD, particulièrement pour la caractérisation des mécanismes d'action de différents PS. Une simple observation visuelle a permis de noter des différences

significatives entre les profils de captation du FDG, dépendamment du PS utilisé. Ces différences offrent une façon rapide de distinguer entre un mécanisme de destruction directe ou indirecte des cellules tumorales et ce, en temps réel.

Toutefois, cette approche basée sur des observations et des approximations comporte malheureusement un grand handicap. Elle ne permet pas, en toute rigueur, de prévoir les comportements tumoraux. Ce mémoire propose une approche plus formelle pour étudier les mécanismes d'action des PS à travers une modélisation pharmacocinétique de la réponse tumorale.

C'est le modèle pharmacocinétique standard du FDG, modèle compartimental, qui a servi de base à notre étude. En effet, nous avons, dans une première approche, introduit la notion de perturbation pour caractériser l'effet du traitement sur le comportement normal d'une tumeur. Mais cette notion de perturbation a mis en évidence le fait que la courbe sanguine est aussi affectée. En tenant compte de cette réalité, il a fallu recourir à l'analyse factorielle pour pouvoir extraire la courbe sanguine qui servira de fonction d'entrée au modèle. Nous avons supposé que cette perturbation portait sur les constantes de transfert entre les compartiments. Cela a permis de relier l'effet du traitement aux paramètres et surtout a démontré l'inutilité probable de la durée prolongée de l'illumination.

Une deuxième approche a consisté à modéliser la tumeur traitée comme un ensemble de deux populations cellulaires. Cela a permis d'abord de prendre en compte la tumeur contrôle du protocole comme une référence, mais surtout d'introduire la notion de survie cellulaire après le traitement.

Mots clés : Thérapie photodynamique, TPD, Tumeurs, Cancer, rat, Tomographie d'émission par positrons, TEP, Photosensibilisateurs, Modélisation pharmacocinétique, Fluorodésoxyglucose, FDG.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	I
LISTE DES TABLEAUX	III
LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	V
I. INTRODUCTION	1
I. 1. THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE (TPD)	2
I. 1. 1 TERMINOLOGIE ET HISTORIQUE	2
I. 1. 2 PRINCIPE GÉNÉRAL DE LA THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE DU CANCER	3
I. 1. 2. 1. LES DOMMAGES CELLULAIRES DIRECTS	5
I. 1. 2. 2. LES DOMMAGES VASCULAIRES	6
I. 1. 2. 3. EFFET SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE	7
I. 1. 2. 4. LES MÉCANISMES D'ACTION DE LA TPD	7
I. 1. 2. 5. AGENTS PS ET APPLICATIONS DE LA THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE	10
I. 1. 2. 6. MÉCANISMES DE RÉPONSE TUMORALE À LA THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE	15
I. 2. TOMOGRAPHIE D'ÉMISSION PAR POSITRONS (TEP)	18
I. 2. 1. PRINCIPE GÉNÉRAL DE LA TEP	18
I. 2. 2. APPLICATIONS DE L'IMAGERIE TEP	22
I. 2. 3. LE RADIOTRACEUR ¹⁸ F-FLUORODÉSOXYGLUCOSE (¹⁸ FDG)	26
I. 2. 4. MESURE DU MÉTABOLISME TUMORAL	27
I. 2. 5. MESURE D'AUTRES PARAMÈTRES TUMORAUX	29
I. 2. 5. 1. DÉBIT SANGUIN	29
I. 2. 5. 2. PROLIFÉRATION CELLULAIRE	33

I. 3. MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE DU FDG	35
I. 4. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU PRÉSENT MÉMOIRE	39
II. RÉSULTATS	43
RÉSUMÉ DU PREMIER ARTICLE	44
II. 1. M'HAMED BENTOURKIA, PATÉ BOUBACAR, VÉRONIQUE BÉRARD, JOHAN E. VAN LIER, AND ROGER LECOMTE. KINETIC MODELING OF PET DATA AND FDG CONTINUOUS INFUSION IN RAT TUMORS SIMULTANEOUSLY TREATED WITH PDT	45
RÉSUMÉ DU DEUXIÈME ARTICLE	63
II. 2. PATÉ BOUBACAR, M'HAMED BENTOURKIA, JOHAN E. VAN LIER, OTMAN SARRHINI AND ROGER LECOMTE. PET KINETIC MODELING OF RAT TUMORS SIMULTANEOUSLY TREATED WITH PHOTODYNAMIC THERAPY: A REFERENCE TISSUE MODEL	64
III. DISCUSSION	81
IV. CONCLUSIONS	86
V. REMERCIEMENTS	89
VI. BIBLIOGRAPHIE	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Liste de quelques PS utilisés en clinique

Tableau 2 - Quelques radiotraceurs utilisés en TEP dans des études du cancer

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Diagramme de Jablonski: de l'excitation d'un PS jusqu'à l'oxydation d'un substrat biologique.	10
Figure 2 - Principe de la tomographie d'émission par positrons.....	20
Figure 3 - Modèle compartimental décrivant le cheminement du ^{18}F FDG en comparaison au glucose.....	27
Figure 4 - Captation cellulaire du ^{64}Cu -PTSM. La molécule de ^{64}Cu -PTSM diffuse à travers la membrane cellulaire et libère ensuite l'atome de cuivre dans la cellule. Des macromolécules intracellulaires captent l'atome de cuivre réduit tandis que la molécule de PTSM quitte la cellule.	31
Figure 5 - Image TEP de la distribution du ^{62}Cu -PTSM chez un patient sain. Importante captation du radiotracer au niveau d'organes bien perfusés comme le cerveau, le cœur et le foie.	32
Figure 6 - Imagerie TEP de la prolifération cellulaire avec le ^{18}F -FLT. Images TEP au ^{18}F -FLT de souris portant des tumeurs RIF-1 réalisées 30-60 min post-injection.	34
Figure 7 - Modèle de trois compartiments pour décrire le comportement du FDG dans le sang (C_p), l'espace interstitiel ou libre (C_f) et le tissu (C_m).	37

LISTE DES ABRÉVIATIONS

$^{13}\text{NH}_3$:	Ammoniac
AlPcS ₄ :	Aluminium phtalocyanine tétrasulfonée
β^+ :	Particule Bêta plus ou Positron
β^- :	Particule Bêta moins
C _f :	Compartiment libre
C _m :	Compartiment métabolique
C _p :	Compartiment plasmatique
C _{pet} :	Compartiment mesuré par la TEP
K ₁ , k ₂ , k ₃ , k ₄ :	Constantes de transfert du modèle standard du FDG
k ₆ –k ₉ :	Facteurs de pondération pendant le traitement
k ₁₀ –k ₁₃ :	Facteurs de pondération après le traitement
keV :	Kilo électron volt
[¹⁸ F]-FDG ou FDG :	2-désoxy-2-[¹⁸ F]-fluoro-D-glucose
g :	Glycémie
I.V. :	Intraveineuse
IRM :	Imagerie par résonance magnétique
LC :	Constante amalgamée qui tient compte du taux de phosphorylation du ¹⁸ FDG (« Lumped Constant »)
LDL :	Lipoprotéines de basse densité (« Low Density Lipoproteins »)

MAC :	Adénocarcinome mammaire (« Mammary Adenocarcinoma »)
mCi :	milliCurie
MLEM :	Maximisation de l'espérance du maximum de vraisemblance (« Maximum Likelihood Expectation Maximization »)
MMRGlc :	Taux de métabolisme de glucose (« Myocardial metabolic rate of glucose
Pc :	Phtalocyanine
PS :	Photosensibilisateurs
ROI :	Région d'intérêt
TAC :	Courbe Temps-Activité
TDM :	Tomodensitométrie
TEP :	Tomographie d'émission par positrons
TPD (PDT) :	Thérapie photodynamique du cancer
ZnPcS ₂ :	Zinc phtalocyanine disulfoné

I. INTRODUCTION

La tomographie d'émission par positrons (TEP) est une technologie d'imagerie fonctionnelle aux applications grandissantes dans les domaines de la cardiologie, de la neurologie et de l'oncologie, ainsi que dans l'étude de plusieurs maladies et dans le développement de nouveaux traitements. La TEP est donc un outil de diagnostic clinique, qui permet de détecter certaines pathologies qui se traduisent par une altération de la physiologie normale comme les cancers. La TEP est aussi utilisée en recherche pré-clinique où elle peut contribuer à l'élaboration ou à l'optimisation de différents protocoles de traitements contre le cancer chez le petit animal. La thérapie photodynamique (TPD) est une des indications cliniques pour le traitement des cancers qui sont localisés et facilement accessibles. Elle est un moyen intéressant pour l'éradication de récurrences locales de tumeurs résistantes à la chimiothérapie. En effet les traitements classiques du cancer sont la chirurgie qui consiste à retirer les tissus envahis par les tumeurs; la radiothérapie qui utilise les rayonnements ionisants émis par certains éléments radioactifs ou par des accélérateurs pour détruire les cellules anormales ou du moins ralentir leur progression; et la chimiothérapie qui implique l'utilisation de produits chimiques ayant un effet direct sur les cellules cancéreuses, soit en les détruisant, soit en empêchant leur prolifération.

Malgré leur efficacité, toutes ces techniques présentent de nombreux inconvénients : la chirurgie est en général trop invalidante pour le malade (même si des progrès sont faits pour diminuer la gêne occasionnée), tandis que la radiothérapie et la chimiothérapie manquent de sélectivité et touchent également les tissus sains. Le

traitement par la TPD se base sur l'utilisation de photosensibilisateurs (PS) qui sont des molécules capables de produire des espèces toxiques pour les cellules en présence d'oxygène et de lumière. Les effets transitoires sur le métabolisme des tumeurs survenant durant la TPD seront étudiés à l'aide de l'imagerie TEP en temps réel.

Nous décrivons ci-dessous le fonctionnement de la thérapie photodynamique et les principes de la TEP. Nous présentons ensuite le modèle pharmacocinétique du fluorodésoxyglucose (^{18}F -FDG), un radiotraceur analogue du glucose que nous avons utilisé pour l'imagerie TEP en simultané avec le traitement des tumeurs chez le rat.

I. 1 Thérapie photodynamique (TPD)

I. 1. 1 Terminologie et historique

La **photothérapie** est l'utilisation de la lumière dans le traitement des pathologies. Au début du XX^{ème} siècle, Finsen démontra qu'il était possible de traiter des patients atteints de lupus vulgaris (tuberculose cutanée) par exposition à la lumière d'une lampe (FINSSEN, 1901). En 1958, Cremer *et al.*, montraient qu'il était possible de traiter les enfants atteints d'ictère en les exposant à de la lumière bleue ($\lambda = 450 \text{ nm}$) pour avoir une action de photosolubilisation et de photofragmentation de la bilirubine responsable de la pathologie (CREMER, *et al.*, 1958).

La **photochimiothérapie** quant à elle est une partie de la photothérapie. Elle consiste en l'administration d'une drogue accompagnée de lumière, comme par exemple l'administration de vitamine D associée à l'exposition aux UV dans le traitement de l'ostéomalacie (JUNG *et al.*, 1978). En 1974, Parrish *et al.*, montraient que l'administration orale de 8-méthylpsoralène et l'exposition aux UV-A pouvaient

être utilisée dans le contrôle du psoriasis (PARRISH, *et al.*, 1974). Le traitement est connu sous le nom de PUVA-thérapie.

La **thérapie photodynamique** est une subdivision de la photochimiothérapie. Elle consiste en l'administration d'un photosensibilisant suivie d'une irradiation lumineuse. La thérapie photodynamique nécessite de plus la présence d'oxygène moléculaire. L'effet photodynamique fut décrit pour la première fois par Oscar Rabb. Rabb montra que l'acridine tuait les paramécies en présence de lumière mais était sans effet sur celles-ci à l'obscurité (RABB, 1900). Par la suite, Von Tappeiner développa le concept d'effet photodynamique (VON TAPPEINER, 1900). Il fut le premier avec l'aide de Jesionek à traiter un patient atteint d'un cancer de la peau avec de l'éosine et une exposition à la lumière (VON TAPPEINER, *et al.*, 1903). La TPD moderne prit naissance lorsqu'il fut démontré que l'hématoporphyrine dérivée (HpD), issue de la purification de l'hématoporphyrine extraite des globules rouges (DRABKIN, 1978), avait une certaine efficacité dans le traitement de tumeurs métastatiques de la peau (DOUGHERTY, *et al.*, 1992; DOUGHERTY, 1993). Dès lors, le développement de la TPD fut lancé, et de nombreux PS sont en phase d'essai ou de développement. Les techniques de TPD ont été testées sur de nombreux types de tumeurs avec plus ou moins de succès, par exemple sur la peau, la vessie, la tête et le cou, (CARRUTH, 1998).

I. 1. 2 Principe général de la thérapie photodynamique du cancer

Les estimations de Santé Canada, pour 2007, étaient de 159 000 nouveaux cas de cancers et 72 700 décès à l'actif de cette maladie au Canada. De plus, d'après ces

mêmes statistiques, 24% des femmes et 28% des hommes seront atteints d'un cancer au cours de leur vie et environ 1 Canadien sur 4 en mourra (SOCIÉTÉ CANADIENNE DU CANCER, <http://www.cancer.ca/>).

Les traitements classiques du cancer sont: la chirurgie qui consiste à retirer les tissus envahis par les tumeurs, la radiothérapie qui utilise les rayonnements ionisants pour détruire les cellules tumorales ou ralentir leur progression, et la chimiothérapie qui implique l'utilisation de produits chimiques ayant un effet direct sur les cellules cancéreuses, soit en les détruisant, soit en empêchant leur prolifération. Malgré leur efficacité, toutes ces techniques présentent de nombreux inconvénients : la chirurgie est en général trop invalidante pour le malade même si des progrès sont faits pour diminuer la gêne occasionnée, tandis que la radiothérapie et la chimiothérapie manquent de sélectivité et touchent également les tissus sains.

Ces traitements conventionnels engendrent donc souvent de sérieux effets secondaires chez les patients. Par conséquent, le développement de nouveaux protocoles de traitement démontrant une plus grande sélectivité pour le tissu malade est très important (SHARMAN *et al.*, 1999). La TPD est une technique d'avant-garde sécuritaire, efficace et médicalement reconnue.

Ce type de thérapie nécessite la présence d'agents PS se localisant dans les tissus tumoraux, de la lumière visible, ainsi que de l'oxygène moléculaire pour y induire des dommages oxydatifs (DOUGHERTY, 1987; HENDERSON et DOUGHERTY, 1992). La double sélectivité de la TPD se traduit par la captation préférentielle du PS par le tissu néoplasique et par la possibilité de limiter l'activation du PS dans ce tissu en restreignant l'illumination sur cette région spécifique

(SHARMAN *et al.*, 1999). Cela permet donc la destruction de la tumeur avec un minimum d'effets néfastes sur les tissus normaux, un avantage très important dans la lutte contre le cancer (DEROSA et CRUTCHLEY, 2002). De plus, contrairement à la radiothérapie et la chimiothérapie, la TPD a un faible potentiel mutagène et, exceptée une certaine phototoxicité de la peau, elle comporte des effets secondaires négligeables (MOAN et PENG, 2003). Aussi le développement d'une résistance tumorale chez des patients soumis aux thérapies traditionnelles peut représenter une indication à traiter avec la TPD (CAPELLA et CAPELLA, 2003). Par contre, les tumeurs traitables par la TPD sont seulement celles pouvant être illuminées directement de façon externe ou interne par endoscopie, limitant ainsi les types de cancers pouvant être traités par cette technique (DETTY *et al.*, 2004). Dans le cas d'un cancer avancé, devenu disséminé dans l'organisme, la TPD peut tout de même améliorer la qualité de vie et même prolonger la survie du patient (BROWN *et al.*, 2004).

La TPD antitumorale est basée sur l'activation par la lumière de molécules photosensibilisatrices dans les tissus néoplasiques. Trois mécanismes essentiels sont responsables des dommages induisant la destruction tumorale. Il s'agit des dommages cellulaires directs, des dommages vasculaires et de l'activation du système immunitaire.

I. 1. 2. 1. Les dommages cellulaires directs

Les dommages aux cellules sont la conséquence de l'altération des fonctions des organites cellulaires et des systèmes membranaires. Ils se caractérisent par deux effets, la nécrose et l'apoptose. Les PS lipophiles ont une affinité particulière pour les

membranes plasmatiques, nucléaires ou mitochondriales (HENDERSON *et al.*, 1992). Les dégradations causées par leur activation se traduisent par des phénomènes inflammatoires et une augmentation de la perméabilité des membranes conduisant à une destruction anarchique des cellules. Les PS hydrophiles sont accumulés dans les cellules par endocytose ou pinocytose. Ils se localisent ensuite dans les organites comme les lysosomes. Les dommages de la TPD causés par les PS entraînent une libération d'enzymes hydrolytiques dans le cytoplasme et ainsi provoquent des phénomènes de nécrose (DOUGHERTY, *et al.*, 1998).

L'apoptose, quant à elle, est une destruction active et est génétiquement contrôlée par les cellules. Elle est caractérisée par des critères morphologiques bien identifiés. D'une manière générale, les mécanismes apoptotiques survenant après TPD seraient associés à l'endommagement des mitochondries (KESSEL, *et al.*, 1997). Un mécanisme indirect ferait intervenir les enzymes lysosomiales, libérées lors de la TPD, dans les dommages provoqués aux mitochondries ce qui déclencherait alors l'apoptose (KESSEL, *et al.*, 2000).

I. 1. 2. 2. Les dommages vasculaires

La plupart des PS provoquent des dommages vasculaires conduisant à l'arrêt du flux sanguin peu après l'initiation du traitement (FINGAR, *et al.*, 2000). La circulation sanguine est le vecteur majeur d'apport d'oxygène et de nutriments vers les tissus et la tumeur. L'endommagement du réseau vasculaire peut conduire à l'hypoxie du tissu, à l'arrêt de l'apport de nutriments et donc à la mort des cellules tumorales (HENDERSON, *et al.*, 1987).

I. 1. 2. 3. Effets sur le système immunitaire

Le troisième mécanisme entrant en jeu dans la destruction des tumeurs implique le système immunitaire. Lorsque la TPD est administrée à une forte intensité, elle peut induire un phénomène d'immunosuppression (ELMETS, *et al.*, 1986). Mais, lorsque la TPD est de faible intensité, elle peut stimuler la réponse immunitaire antitumorale. La dégradation des cellules tumorales provoque un largage massif de fragments membranaires qui vont attirer les cellules du système immunitaire et provoquer ainsi un événement initiateur d'inflammation (KORBELIK, 1996). Ces mécanismes sont causés par la libération de cytokines et de médiateurs inflammatoires qui vont recruter les cellules du système immunitaire tels que les lymphocytes ou les macrophages.

I. 1. 2. 4. Les mécanismes d'action de la TPD

Les réactions photodynamiques nécessitent la présence simultanée d'un PS, de lumière à longueur d'onde appropriée et d'oxygène. Lorsque le PS dans son état fondamental (S_0) absorbe un photon d'énergie $h\nu$, il passe à un niveau d'énergie singulet excité ($^1S^*$) (Figure 1). L'état singulet excité ($^1S^*$) est très instable et a une durée de vie très courte (~ 100 ns). Il peut par l'intermédiaire de transition intersystème et d'un changement de spin aller vers le premier niveau de l'état triplet ($^3S^*$) (SOBOLEV, *et al.*, 2000). La durée de vie des espèces réactives à l'état triplet excité (~ 500 ns) est bien plus longue que celle de l'état singulet excité ($^1S^*$). Par conséquent, l'état triplet est une condition importante pour une action efficace des PS (OCHSNER, 1997). Le PS a le temps de réagir avec les molécules environnantes selon plusieurs mécanismes décrits plus bas (réactions de types I et II).

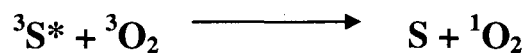
I. 1. 2. 4. 1 Les réactions de type I

Elles résultent du transfert d'électrons ou d'hydrogène entre le PS à l'état triplet excité et un substrat se trouvant à proximité. Deux types de réactions peuvent se produire. Dans la première, un électron est transféré du PS à l'état $^3S^*$ vers un substrat (R) voisin. Le substrat est réduit et ne réagit pas avec l'oxygène environnant. Dans la seconde réaction, un électron est transféré du substrat (R) vers le PS à l'état $^3S^*$ conduisant à l'apparition d'un radical susceptible de réagir avec l'oxygène environnant.

Cette seconde réaction peut aussi indirectement conduire à l'oxydation du substrat. Les radicaux peuvent être générés au niveau d'acides aminés facilement oxydables présents à l'intérieur des protéines membranaires (cystéine, méthionine, tryptophane et tyrosine) (RODGERS, 1993). Ceux-ci peuvent amener à une altération des structures et des propriétés fonctionnelles de ces protéines. Les radicaux produits lors de ces réactions peuvent également opérer un échange d'électrons avec l'oxygène moléculaire (3O_2) pour former des espèces réactives de l'oxygène, produits de photooxydation très puissants tels que les radicaux OH^\bullet , HO_2^\bullet , H_2O_2 et $O_2^{\bullet-}$. D'une manière générale c'est le radical hydroxyle (OH^\bullet) qui est impliqué dans l'oxydation d'une grande variété de molécules (OCHSNER, 1997). Ces réactions sont plus efficaces à faible concentration d'oxygène et forte concentration de substrat (FOOTE, 1984).

I. 1. 2. 4. 2 Les réactions de type II

Ces réactions (**Figure 1**), sont impliquées dans la génération d'oxygène singulet. L'oxygène moléculaire à l'état fondamental se trouve à l'état triplet ($^3\text{O}_2$). Le PS excité à l'état triplet ($^3\text{S}^*$) transfère son énergie à l'oxygène moléculaire qui passe de l'état triplet stable ($^3\text{O}_2$) à l'état singulet excité ($^1\text{O}_2$).



L'interaction de l'oxygène singulet avec le milieu intracellulaire entraîne des dommages à la membrane cellulaire, aux mitochondries, aux lysosomes, au noyau et induit la nécrose tumorale (OCHSNER, 1997).

L'oxygène singulet est une espèce métastable dont la durée de vie varie en fonction du milieu, de 4 microsecondes dans l'eau jusqu'à 100 microsecondes dans un solvant organique non polaire proche de l'environnement lipidique de la cellule (FOOTE, 1984). Les dommages aux cellules sont augmentés lorsque le PS et la cible se trouvent dans des régions cellulaires hydrophobes (RICCHELLI, 1995). Certaines molécules sont capables d'inhiber l'action de l'oxygène singulet au sein des cellules comme par exemple l'azide de sodium (MELNIKOVA, *et al.*, 1999), le β -carotène ou le 1.4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) (FOOTE, 1984).

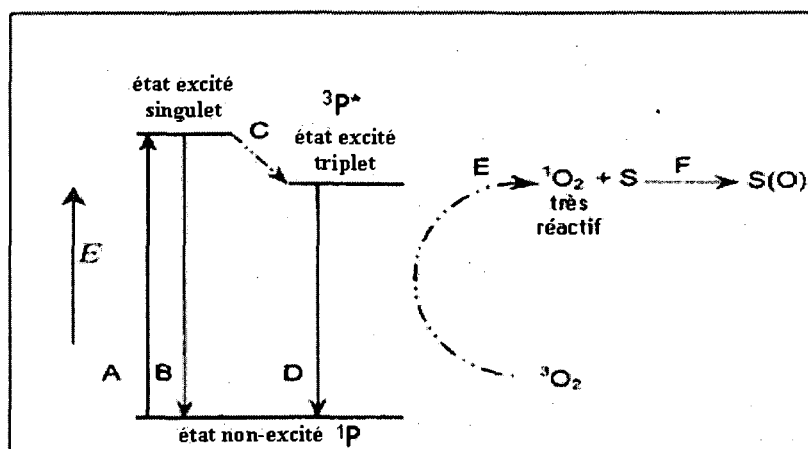


Figure 1 - Diagramme de Jablonski: de l'excitation d'un PS jusqu'à l'oxydation d'un substrat biologique (Image modifiée de MacDonald *et al.*, 2001).

A : Excitation du PS par l'énergie lumineuse appropriée

B : Relaxation par fluorescence

C : Passage de l'état excité singulet à triplet

D : Relaxation par phosphorescence

E : Transfert de l'énergie et passage de l'oxygène moléculaire à l'oxygène singulet très réactif

F : Oxydation d'un substrat biologique par l'oxygène singulet.

I. 1. 2. 5. Agents PS et applications de la thérapie photodynamique

I. 1. 2. 5. 1 Historique

Au début des années 90, le Photofrin[®] (porfimère sodique) issu de la purification de l'hématoporphyrine dérivée (HpD) a été le premier PS à obtenir une autorisation de mise sur le marché, délivrée par le Canada, le Japon, les Pays-Bas et les États-Unis pour le traitement de cancers oesophagiens, bronchiques, gastriques et de la vessie (DOUGHERTY, 1993). Malgré les résultats obtenus, certains facteurs importants limitent son utilisation tels qu'un coefficient d'absorption faible dans le rouge et une sélectivité relativement faible pour les tissus tumoraux (HONGYING, *et al.*, 1999). De plus, une photosensibilisation cutanée durable oblige les patients à se

protéger de la lumière pendant 4 à 6 semaines après l'administration (KESSEL et DOUGHERTY, 1999). Ces constatations vont conduire au développement des PS de deuxième et troisième générations dans le but de palier aux inconvénients du Photofrin®. Aujourd'hui, outre les PS ayant reçu une approbation de la FDA américaine (Photofrin®, Levulan®, Visudyne®), de nombreux autres PS sont en phase d'essais cliniques I, II ou III

I. 1. 2. 5. 2 Le PS idéal en thérapie photodynamique

Les PS de première génération sont représentés par l'HpD. C'est un mélange complexe de diverses porphyrines provenant de la transformation de l'hémoglobine. Sa bande d'absorption est de faible intensité et n'induit par conséquent qu'un faible effet photochimique. L'utilisation de l'HpD en thérapie photodynamique a permis de définir les propriétés d'un PS idéal pour aboutir à une action efficace (BONNETT, *et al.*, 1989; MAC ROBERT, *et al.*, 1989).

- La toxicité du PS doit être faible voire nulle à l'obscurité.
- La pharmacocinétique de la molécule doit permettre de favoriser une bonne sélectivité des tissus tumoraux par rapport aux tissus sains et une élimination rapide par l'organisme. Il sera de préférence amphiphile pour s'incorporer dans les milieux hydrophiles comme les lysosomes et hydrophobes comme les mitochondries (ALLEN, *et al.*, 2001, BONNEAU 2007).
- Le PS doit être de préférence une substance pure et de composition constante.

- Il doit avoir un rendement quantique en oxygène singulet élevé de manière à induire les réactions photochimiques les plus efficaces possibles.
- Le PS doit être caractérisé par une forte absorption dans les longueurs d'onde rouges entre 650 et 800 nm. C'est cette gamme de longueurs qui caractérise la fenêtre thérapeutique c'est-à-dire la gamme de longueurs d'ondes où le traitement est plus efficace.

I. 1. 2. 5. 3 Les PS de deuxième et troisième générations

La structure de base de la plupart des PS est le noyau tétrapyrrolique. Une modification du pyrrole par réduction des doubles liaisons ou la modification des substituants conduit à la formation des nouveaux PS dits « de deuxième génération ». Il comprennent plusieurs classes de molécules tels que les chlorines, les purpurines (SnET2), les benzoporphyrines (BPD), les texaphyrines (Lutetium texaphyrin) (OLEINICK, *et al.*, 1998). L'acide aminolevulinique (ALA) et les phtalocyanines.

Les molécules de phtalocyanines ont longtemps été utilisées comme agents colorants dans l'industrie et ont même été employées en tant qu'agents photoconducteurs dans les photocopieurs (SHARMAN *et al.*, 1999). Au niveau médical, les phtalocyanines ont largement été étudiées en raison de leur forte absorption dans la région rouge du spectre ($\lambda = 680$ nm) où la transparence des tissus est optimale (ALI et VAN LIER, 1999). De plus, la sensibilité de la peau du sujet au soleil est négligeable puisque les phtalocyanines absorbent très peu à des longueurs d'onde entre 400-600 nm comparativement aux porphyrines (MOSA *et al.*, 1997). Afin d'augmenter leur activité photodynamique, un ion métallique diamagnétique comme le Zn^{2+} ou l' Al^{3+} est souvent incorporé au centre de la molécule de

phthalocyanine, ce qui augmente la durée de vie du PS à l'état triplet ainsi que leur rendement (VAN LIER et SPIKES, 1989). Leur synthèse chimique et leur structure permettent donc l'addition de substitués au niveau du métal central, mais aussi en périphérie de leur macrocycle hydrophobe (ALLEN *et al.*, 2001). Des facteurs comme la structure, la charge et le degré d'hydrophobicité du PS déterminent ses interactions avec lui-même et les composantes biologiques qui l'entourent, ce qui favorise donc sa localisation tumorale et son efficacité thérapeutique (MACDONALD et DOUGHERTY, 2001).

Les PS de troisième génération ont été élaborés dans le but d'induire une spécificité biologique. Ce sont des dérivés de molécules de deuxième génération liés ou introduits dans des structures chimiques (acides aminés, protéines, polymères, anticorps) afin d'acheminer ces substances vers des cellules de type défini (MOSER, 1998). Une augmentation de l'incorporation des PS dans les cellules tumorales est obtenue. Cependant, cette augmentation ne tend jamais vers une incorporation tumorale spécifique.

La thérapie photodynamique a subi une évolution très rapide depuis 1997 tant au niveau de ses applications cliniques qu'en recherche. En effet, elle a été approuvée par la « U.S. Food and Drug Administration » (FDA) ainsi que par plusieurs autres agences de santé à travers le monde et est maintenant considérée comme le traitement standard dans plusieurs cas cliniques (DETTY *et al.*, 2004; SHARMAN *et al.*, 1999). Dans le domaine de l'oncologie, la TPD sert à traiter plusieurs cas de cancer dont ceux de la peau, du tractus aéro-digestif, du sein, de la vessie, de la tête et du cou. D'autres conditions non-malignes comme le psoriasis, les taches de vin, la

dégénérescence maculaire liée à l'âge et la resténose, c'est-à-dire le rétrécissement répétitif d'une artère après une chirurgie correctrice peuvent aussi être traitées à l'aide de la TPD (DOUGHERTY *et al.*, 1998; DOUGHERTY, 2002; MOAN et PENG, 2003). La thérapie photodynamique est donc une modalité de traitement prometteuse acceptée en clinique au niveau curatif ou palliatif en oncologie, mais elle est aussi employée en dermatologie, en ophtalmologie et en cardiologie pour soigner d'autres conditions non-malignes, ainsi que pour la stérilisation du plasma sanguin. (1987; PEASTON *et al.*, 1993). Le tableau I illustre quelques domaines d'application de la TPD. Il est à noter que la thérapie photodynamique est aussi utilisée en médecine vétérinaire dans le traitement de divers cancers chez les chiens et les chats (CHELI *et al.*, 1987; PEASTON *et al.*, 1993).

Tableau 1 - Liste de quelques PS utilisés en clinique
(Brown *et al.*, 2004; Moan *et al.*, 2003; Sharman *et al.*, 1999).

CLASSES	PS	APPLICATIONS CLINIQUES
Porphyrines	Dérivé d'hématoporphyrine (Photofrin®)	Cancers de l'œsophage, du poumon, de l'estomac et de la vessie
	Dérivé d'hématoporphyrine (Photoheme)	Cancers de la peau, du sein, du tractus aéro-digestif et psoriasis
	Acide aminolevulinique ou ALA (Levulan®)	Kératose actinique et cancers de la peau
Phtalocyanines	AlPcS (Photosense)	Cancers de l'œsophage, du poumon, de l'estomac, de la peau et du sein
Chlorines	Temoporfin (Foscan®)	Cancers du cou et de la tête
	Verteporfin (Visudyne™)	Dégénérescence maculaire
Thiazines	Bleu de méthylène	Stérilisation du plasma sanguin

I. 1. 2. 6. Mécanismes de réponse tumorale à la thérapie

photodynamique

Les résultats de plusieurs études sur la thérapie photodynamique du cancer chez des rongeurs ont montré l'existence de différents types de mécanismes d'action pouvant mener à la régression des tumeurs (PENG *et al.*, 1990; ZHOU, 1989). Lorsque la TPD endommage la membrane des cellules tumorales ou celle de leurs

organelles, via l'oxydation de leurs composantes lipidiques et protéiques, il s'ensuit une altération de la perméabilité et de la fluidité membranaires, ainsi qu'une inactivation du fonctionnement des enzymes et des récepteurs associés à ces membranes. Ce type de mécanisme d'action est donc qualifié de direct, puisque la mort des cellules tumorales a lieu suite à des dommages faits à même les constituants cellulaires, comme la membrane plasmique, les lysosomes et les mitochondries (DOUGHERTY *et al.*, 1998; GIROTTI, 1990; ZHOU, 1989).

Lorsque la TPD endommage plutôt l'endothélium vasculaire de la tumeur, c'est-à-dire les cellules endothéliales bordant les vaisseaux sanguins tumoraux, il s'ensuit une production de composés vasoactifs divers tels que des eïcosanoïdes comme le tromboxane, des cytokines et de l'histamine et des facteurs de coagulation. Ceci engendre une augmentation de la perméabilité vasculaire aux macromolécules, la constriction des vaisseaux, l'agrégation de plaquettes et éventuellement une stase vasculaire (BEN-HUR *et al.*, 1988; FINGAR, 1996). Étant donné que la présence d'un flot sanguin tumoral adéquat est nécessaire pour approvisionner les cellules en nutriments et en oxygène, s'il est altéré suite à un traitement comme la TPD par exemple, les cellules tumorales affectées peuvent manquer de nutriments, souffrir d'hypoxie et finalement mourir (HENDERSON et FINGAR, 1987). Ce type de mécanisme d'action est donc qualifié d'indirect, puisque la mort des cellules tumorales a lieu suite à des dommages faits aux vaisseaux sanguins les irriguant (OLEINICK et EVANS, 1998; ZHOU, 1989). En plus, une réponse inflammatoire a aussi souvent lieu au niveau de la tumeur traitée et des tissus environnants,

contribuant aussi à la mort des cellules tumorales suite à la TPD (KORBELIK et KROSL, 1994; KROSL *et al.*, 1995; YAMAMOTO *et al.*, 1992).

La façon dont se déroulera la réponse tumorale au traitement dépend quant à elle de la distribution relative des molécules de PS dans les compartiments cellulaires et vasculaires au moment de l'illumination, qui elle dépend de la nature chimique du PS utilisé et de la façon dont il est acheminé dans l'organisme (ALI *et al.*, 1988; BOYLE *et al.*, 1992; BRASSEUR *et al.*, 1996; KESSEL *et al.*, 1987; KRAMMER, 2001). Ceux de nature hydrophobe ou amphiphile, comme la drogue disulfonée ZnPcS_2 , sont préférentiellement transportés par des lipoprotéines qui pénètrent directement dans les cellules tumorales via des récepteurs à LDL (JORI et REDDI, 1993; JORI, 1989; MAZIERE *et al.*, 1991; PENG et MOAN, 1995; PENG *et al.*, 1990). Les PS hydrophiles comme la drogue tétrasulfonée AlPcS_4 sont plutôt transportés par l'albumine sérique et il en résulte une accumulation dans les espaces interstitiels et le stroma vasculaire de la tumeur (JORI, 1989; KESSEL *et al.*, 1987; KONGSHAUG, 1992; PENG et MOAN, 1995; PENG *et al.*, 1990; PENG *et al.*, 1991).

La localisation des molécules de PS a donc une énorme implication au niveau du mécanisme par lequel la thérapie photodynamique engendre la régression tumorale. Par conséquent la TPD faite avec des PS hydrophobes ou amphiphiles, comme le ZnPcS_2 , endommage plusieurs constituants cellulaires et engendre donc la mort directe des cellules tumorales. Alors que la TPD faite avec des PS hydrophiles, comme le AlPcS_4 , endommage les vaisseaux sanguins tumoraux, interrompant l'apport en oxygène et nutriments, ce qui résulte aussi en la mort des cellules mais de façon indirecte (CHAN *et al.*, 1996; CHAN *et al.*, 1997; HENDERSON *et al.*, 1985;

MILANESI *et al.*, 1990; PENG *et al.*, 1990; ROSENTHAL, 1991; VAN LIER et SPIKES, 1989).

I. 2. Tomographie d'émission par positrons (TEP)

I. 2. 1. Principe général de la TEP

La tomographie d'émission par positrons (TEP) est une technologie d'imagerie moléculaire qui utilise des molécules radiomarquées pour produire des images de la distribution des radiotraceurs dans l'organisme. En effet, le radiotraceur interagit avec son environnement in-vivo, au niveau de divers processus biologiques se déroulant dans un organisme, tout comme les sciences pharmaceutiques utilisent des molécules pour qu'elles agissent de façon thérapeutique au niveau de divers processus biologiques (PHELPS, 2000). Cette technologie d'imagerie médicale nécessite d'abord la production de radioisotopes émetteurs de positrons (β^+) à l'aide d'un cyclotron, par bombardement de cibles spécifiques d'éléments stables à l'aide de protons ou de deutons accélérés à des énergies de plusieurs MeV. Le cyclotron est un accélérateur électromagnétique de haute fréquence mis au point en 1929 par Ernest Orlando Lawrence aux États-Unis. Dans son principe, le cyclotron est constitué de deux électrodes demi-circulaires en forme de D appelés 'dés', séparés par un espace étroit appelé la chambre d'accélération, auxquels est appliqué un champ électrique alternatif de haute fréquence (SAHA, 1998). Les deux 'dés' sont plongés horizontalement dans un champ magnétique uniforme vertical. Le champ électrique permet l'accélération d'ion d'hydrogène chargé négativement, tandis que le champ

magnétique sert à lui donner une trajectoire en spirale. La particule parcourt ainsi plusieurs tours avant d'être extraite de l'accélérateur, lorsqu'elle atteint l'énergie cinétique adéquate (10 à 19 MeV). La cible est ainsi bombardée par un faisceau de protons pour produire l'élément radioactif appelé radioisotope. Une fois le radioisotope produit, il est incorporé par la radiochimie dans une molécule pour produire un radiotraceur.

À chaque désintégration β^+ , le positron émis du noyau parcourt une courte distance avant de subir une annihilation avec un électron présent dans le tissu. L'annihilation de ces deux particules résulte en l'émission simultanée de deux photons de 511 keV à 180° l'un de l'autre. Il y a ensuite détection simultanée des photons d'annihilation par des détecteurs opposés situés sur un anneau du tomographe. L'acquisition d'un grand nombre de ces événements permet, avec des techniques de reconstruction tomographique, de reconstituer la distribution de la source d'activité à l'intérieur du sujet sous étude, générant les images TEP (LECOMTE *et al.*, 2002).

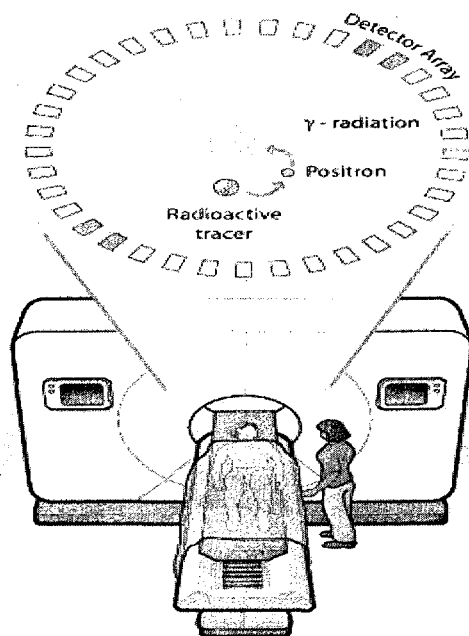


Figure 2 - Principe de la tomographie d'émission par positrons. Le radiotraceur est injecté dans le patient avant ou pendant la mesure TEP. Le positron émis par l'isotope incorporé au radiotraceur s'annihile avec un électron présent dans le sujet produisant deux photons d'annihilation émis dans des directions opposées. Le scanner TEP détecte un grand nombre de rayons résultant de ces interactions et l'image est par la suite reconstruite de façon statique ou dynamique. Image provenant de <http://www.scq.ubc.ca/looking-inside-the-human-body-using-positrons/>

Les principaux radionucléides émetteurs de positrons d'intérêt en recherche et en médecine nucléaire sont le fluor-18 ($t_{1/2} = 109,8$ min), l'azote-13 ($t_{1/2} = 10$ min), l'oxygène-15 ($t_{1/2} = 2,03$ min), le carbone-11 ($t_{1/2} = 20,4$ min), l'iode-124 ($t_{1/2} = 4,17$ j), le cuivre-62 ($t_{1/2} = 9,74$ min) et le cuivre-64 ($t_{1/2} = 12,7$ h) (CHERRY et GAMBHIR, 2001). $t_{1/2}$ est la demi-vie, soit le temps au bout duquel la radioactivité de départ est réduite de moitié. Une des limitations de la TEP est reliée à la courte demi-vie de quelques-uns de ces radionucléides, amenant des restrictions dans le temps disponible pour faire la synthèse radiochimique, car les radioisotopes émetteurs de positrons sont rarement utilisés dans leur état natif pour l'imagerie, mais sont plutôt introduits dans

des molécules comme marqueur radioactif permettant de suivre le cheminement du produit radiopharmaceutique à l'intérieur de l'organisme. La présence d'un cyclotron sur le site même des études pré-cliniques ou cliniques est donc nécessaire (ABOAGYE et PRICE, 2003; LECOMTE *et al.*, 2002).

Le Tableau 2 illustre quelques radiotraceurs et leurs applications au niveau de la TEP en oncologie comme l'évaluation du métabolisme du glucose, de la prolifération cellulaire et de la perfusion sanguine. Les isotopes sont incorporés aux molécules, généralement, sans avoir à modifier leurs propriétés biologiques ou pharmacologiques originales. Le choix d'un isotope est choisi selon les propriétés chimiques qui déterminent si le marquage est possible et du mode de désintégration qui permet une détection externe du rayonnement émis. Les émetteurs de positrons les plus utilisés en TEP sont fonctions de leurs caractéristiques physiques et de leur demi-vie.

Tableau 2 - Quelques radiotraceurs utilisés en TEP dans des études du cancer

Tableau modifié de Lecomte et al., 2002.

RADIOTRACEURS	APPLICATIONS
[¹⁸ F]-Fluorodésoxyglucose (FDG)	Métabolisme du glucose
[¹⁸ F]-Fluorothymidine (FLT)	Synthèse d'ADN / Prolifération cellulaire
[¹⁸ F]-Fluorure	Remodelage osseux dû à la présence de métastases
[¹³ N]-NH ₃ , [¹⁵ O]-H ₂ O et [^{62,64} Cu]-PTSM	Perfusion sanguine
[¹⁸ F]-Fluoromisonidazole (FMISO)	Hypoxie
[¹⁸ F]-Fluoroestradiol (FES)	Cancers du sein / Liaison aux récepteurs

I. 2. 2. Applications de l'imagerie TEP

La TEP trouve de nombreuses applications en recherche aussi bien qu'en clinique. Il s'agit d'une technique d'imagerie nucléaire fonctionnelle permettant de déterminer de façon non-invasive la distribution spatiale et temporelle de diverses molécules marquées avec un radioisotope émetteur de positrons. En obtenant des images tomographiques séquentiellement dans le temps à l'aide de la TEP, il est possible de recueillir des informations *in vivo* sur l'évolution de divers processus physiologiques et biochimiques au niveau moléculaire (TATSUMI *et al.*, 2003). Des modèles mathématiques peuvent ensuite être appliqués à ces séries d'images temporelles pour décrire la cinétique des radiotraceurs et extraire des paramètres d'intérêt biologique tels que la consommation de glucose ou d'oxygène, la perfusion sanguine et le taux d'occupation de récepteurs spécifiques (LECOMTE *et al.*, 2002).

L'imagerie TEP dispose donc d'un grand nombre d'applications possibles dans les secteurs de la neurologie, de la cardiologie et de l'oncologie (HERSCHMAN, 2003; MYERS, 2001). De plus, l'imagerie TEP rejoint aussi le domaine de la biologie moléculaire en permettant l'étude de l'expression de divers gènes (IYER *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2002) ainsi que l'étude de la distribution d'antigènes en utilisant des anticorps radiomarqués (SUNDARESAN *et al.*, 2003). Cette modalité d'imagerie fonctionnelle comporte par contre une faiblesse au niveau anatomique. La corrélation anatomique des régions de captation s'avère souvent difficile sur les images TEP, surtout lors d'études moléculaires. Afin de fournir des repères anatomiques pour faciliter l'interprétation des images, l'imagerie TEP peut être combinée avec une technique d'imagerie anatomique non-invasive, telle que la tomodensitométrie (TDM) (TOWNSEND *et al.*, 1998) ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (SLATES *et al.*, 1999) générant ainsi des images anatomo-moléculaires. Heureusement ces technologies sont maintenant aussi adaptées pour l'imagerie de petits animaux de laboratoire (WEISSLEDER et MAHMOOD, 2001).

L'imagerie TEP en oncologie avec le radiotracer FDG mesurant le métabolisme du glucose est très utilisée afin d'évaluer de façon précoce l'existence ou non d'un effet anti-tumoral lors de l'application de divers traitements au niveau pré-clinique et clinique (CHAIKEN *et al.*, 1993; RIGO *et al.*, 1996). Son utilité dans l'évaluation de la réponse tumorale suite à la thérapie photodynamique a été démontrée (LAPOINTE *et al.*, 1999; MOORE *et al.*, 1998). En effet, l'emploi de l'imagerie TEP animale lors d'études pré-cliniques sur la thérapie photodynamique du cancer s'est avéré concluant et cela devrait encourager les cliniciens utilisant la TPD à

instaurer l'imagerie TEP au FDG pour prédire la réponse tumorale chez leurs patients suite au traitement (MOORE *et al.*, 1997).

L'observation de changements morphologiques au niveau de la dimension et de la composition des tumeurs, sans l'utilisation de l'imagerie médicale, était auparavant la façon standard employée pour évaluer l'efficacité d'un traitement lors d'études pré-cliniques. Cependant, ces changements surviennent souvent après un certain temps et il est donc difficile d'évaluer une réponse tôt suite au traitement (SUGIYAMA *et al.*, 2004). La TEP en oncologie est donc très avantageuse car la physiologie et le métabolisme tumoral changent beaucoup plus rapidement en réponse aux traitements que la morphologie de la lésion elle-même. Ainsi, la TEP permet d'établir beaucoup plus rapidement le succès ou l'échec d'une intervention donnée (LECOMTE *et al.*, 2002; WEBER *et al.*, 2000). En effet, plusieurs groupes ont remarqué que la diminution de la captation du FDG était plus prononcée que la réduction de la taille des tumeurs peu de temps suite à des séances de radiothérapie ou de chimiothérapie chez des souris (ABE *et al.*, 1986; YOSHIOKA *et al.*, 1997). D'autres études sont en accord sur le fait que *l'information* obtenue est incomplète avec seulement des mesures standards de la morphologie des tumeurs car les résultats complémentaires obtenus avec l'imagerie TEP permettent de suivre plus adéquatement la réponse thérapeutique pour ainsi déterminer l'efficacité globale du traitement ou ses mécanismes d'action (LEWIS *et al.*, 2001; MARGARON *et al.*, 1996). L'idéal est de combiner des techniques d'imagerie métabolique et anatomique, telle que la technologie TEP/TDM, ce qui permettrait assurément d'améliorer le suivi thérapeutique en reliant la viabilité tumorale à la masse totale de la tumeur (WEBER

et al, 2000). De plus, l'utilisation de techniques d'imagerie permet d'effectuer des mesures répétées chez le même animal, facilitant ainsi le suivi d'une intervention thérapeutique et permettant à chaque animal de servir comme son propre contrôle.

Lorsqu'il s'agit d'études *ex vivo*, les mesures ne peuvent être réalisées qu'à des temps sélectionnés, rendant très exhaustives et variables les études voulant observer des changements physiologiques et suivre le cours d'une réponse thérapeutique. De plus lorsque des prélèvements sont effectués, ils sont souvent faits au hasard ou bien sur des régions spécifiques choisies sur la lésion ou le tissu en entier, alors que l'imagerie *in vivo* nous donne de l'information sur la physiologie et la pathologie au niveau microenvironnemental même de la totalité de la région désirée (CECKLER et al., 1991). En effet, avec les techniques *in vitro* de culture cellulaire et d'hybridation *in situ*, plusieurs désordres biologiques sont étudiés avec des molécules radiomarquées. Cependant, ces systèmes d'études sont grandement simplifiés, alors que la TEP peut suivre ces mêmes molécules dans l'organisme tout entier, incluant les effets de transport, de métabolisme, d'excrétion et d'interactions entre les organes, ces facteurs étant souvent déterminants dans l'évaluation de l'efficacité d'un nouveau traitement (CHERRY et GAMBHIR, 2001). Plusieurs compagnies pharmaceutiques utilisent maintenant l'imagerie TEP moléculaire dans le cadre de leur recherche de nouveaux médicaments ainsi que dans le criblage *in vivo* afin de déterminer le meilleur médicament parmi quelques médicaments potentiels (CHATZIOANNOU, 2002).

Aussi, lorsque de nouveaux radiotraceurs émetteurs de positrons sont synthétisés, leur biodistribution dans le temps doit être étudiée chez des modèles

animaux vivants. Les biodistributions traditionnelles se font par dissection, donc on ne peut évidemment pas reprendre le même animal pour des études répétées. Tandis qu'avec l'imagerie TEP, il est possible de répéter les mesures sur le même animal afin de connaître la biodistribution spatiale et temporelle des radiotraceurs étudiés. Ainsi l'utilisation du même animal pour des études subséquentes réduirait la variabilité causée par les différences entre les sujets.

I. 1. 2. 6. I. 2. 3 Le radiotraceur ^{18}F -Fluorodésoxyglucose (^{18}F FDG)

Le ^{18}F -Fluorodésoxyglucose (FDG) est une molécule de désoxyglucose marquée au fluor ^{18}F . Le désoxyglucose est un analogue du glucose. En effet, la seule différence entre les deux est que l'on procède au remplacement d'un groupe hydroxyle (OH), dans la formule du glucose, par le ^{18}F pour former le FDG. Ce radiotraceur a une demi-vie de 110 minutes et est le plus fréquemment utilisé en imagerie TEP. Le désoxyglucose emprunte le même transporteur membranaire que le glucose. Comme lui, il est phosphorylé en FDG-6-PO₄ par les enzymes hexokinases, mais il n'est pas transformé davantage dans la cellule. Bien qu'il existe une voie de réaction inverse pour le FDG, cette réversibilité est faible et certains auteurs la négligent dans le cœur et dans les tumeurs.

La TEP permet de mesurer globalement la concentration du FDG dans les vaisseaux sanguins, dans le liquide interstitiel et sous forme de FDG phosphorylé. Pour calculer le métabolisme du glucose dans un tissu, la mesure TEP se fait en fonction du temps afin d'obtenir des images dynamiques. Aussi la concentration du radiotraceur dans le sang devrait être connue. La figure 3 représente une comparaison

entre le FDG et le glucose sous forme de compartiments à savoir le compartiment sanguin, le compartiment libre et le compartiment métabolisé.

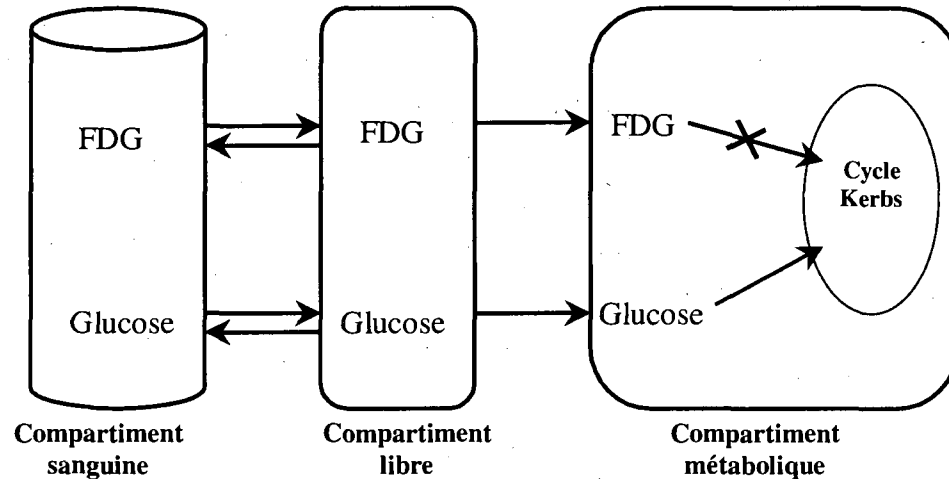


Figure 3 - Modèle compartimental décrivant le cheminement du ^{18}F FDG en comparaison au glucose.

I. 2. 4. Mesure du métabolisme tumoral

Tant au niveau de l'imagerie TEP cardiaque, oncologique que cérébrale, le FDG est très utilisé en clinique et il est aussi le plus couramment employé dans le cadre des études précliniques chez les animaux. Sa captation par divers tissus reflète leur niveau de métabolisme du glucose et ce dernier se trouve altéré dans de vastes cas de désordres biologiques et de maladies, comme les cas de cancers. De plus, lors des études d'imagerie, la quantité de FDG injectée est de beaucoup inférieure à celle nécessaire pour produire des effets pharmacologiques (PHELPS, 2000).

Dès les années 1930, Warburg a observé l'augmentation du métabolisme du glucose dans des tumeurs malignes (WARBURG, 1956). En effet, la captation

tumorale du glucose et de son analogue FDG est favorisée entre autres par l'augmentation du nombre de molécules de transport du glucose, appelées GLUT, à la surface des cellules tumorales (SMITH, 1998). Ensuite, l'enzyme hexokinase leur ajoute un groupement phosphate afin qu'ils puissent entrer dans le processus de la glycolyse. Alors que le métabolisme du glucose-6-phosphate se poursuit sous l'action d'autres enzymes jusqu'à éventuellement créer de l'énergie, de l'eau et du CO₂, le FDG-6-phosphate n'est pas un substrat pour les réactions subséquentes du cycle glycolytique et demeure essentiellement piégé à l'intérieur de la cellule sans subir de dégradation immédiate significative (LECOMTE *et al.*, 2002; WEBER, 1968).

Le glucose et le FDG sont transportés à travers les capillaires et la membrane cellulaire et sont phosphorylés par l'enzyme hexokinase. Seul le glucose-6-P entre dans le cycle glycolytique pour y être métabolisé, alors que le FDG demeure piégé dans la cellule. Il en résulte une accumulation du radiotraceur FDG qui constitue un reflet fidèle du taux d'utilisation du glucose et qui peut être utilisé comme indice de survie des cellules tumorales après l'application d'un traitement (LECOMTE *et al.*, 2002). De plus, la consommation accrue de glucose et de FDG par les tumeurs, comparée à celle des tissus sains environnants, combinée à l'élimination rapide du FDG par la plupart des autres tissus et organes engendre des images TEP de haut contraste illustrant l'activité métabolique tumorale. Ceci est primordial dans la détection des tumeurs cancéreuses ainsi que dans leur suivi aux traitements (CHAIKEN *et al.*, 1993). De plus, les sujets à l'étude doivent préférablement être à jeûn car des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré une relation inverse entre le niveau

de glucose extracellulaire et la captation de FDG dans les cellules tumorales (WAHL *et al.*, 1992).

Le FDG est capté par plusieurs organes et tissus tels que le cerveau, le cœur, le tractus gastrointestinal et les tumeurs. Cependant même si le FDG procure des informations très utiles au niveau des tumeurs, certaines études cliniques et pré-cliniques ont nécessité ou nécessiteront le développement de radiotraceurs alternatifs plus spécifiques relevant des processus cellulaires précis comme la prolifération cellulaire, l'hypoxie et l'apoptose (BLANKENBERG, 2004; CARNOCHAN et BROOKS, 1999; GRONROOS *et al.*, 2004).

I. 2. 5. Mesure d'autres paramètres tumoraux

I. 1. 2. 7. I. 2. 5. 1 Débit sanguin

La TEP est aussi souvent utilisée dans l'évaluation de la perfusion sanguine myocardique, afin d'évaluer la viabilité du myocarde suite à un infarctus ou une transplantation cardiaque par exemple (HOVE *et al.*, 2003). La TEP est aussi très utile au niveau d'études cérébrales variées sur des patients schizophréniques, amnésiques ou ayant subi un accident cérébro-vasculaire par exemple (EUSTACHE *et al.*, 1997; SAHA *et al.*, 1994; WEBER *et al.*, 2004). Habituellement, l'étude du débit sanguin dans ces tissus se fait à l'aide de radiotraceurs comme l'ammoniac ($[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$) ou l'eau ($[^{15}\text{O}]\text{-H}_2\text{O}$) radiomarqués. En oncologie, en complément des études métaboliques, des mesures TEP du débit sanguin tumoral seraient aussi très pertinentes dans l'évaluation de la pathophysiologie des tumeurs, ainsi que dans la planification et le suivi des interventions thérapeutiques (HAWKINS et PHELPS,

1988; XIANGSONG *et al.*, 2006). En effet, la caractérisation de la perfusion tumorale préalablement au traitement peut représenter pour les cliniciens un outil rationnel au niveau du choix et de la planification de la thérapie, en plus de fournir un indice pronostique important (LECOMTE *et al.*, 2002).

Le pyruvaldéhyde-bis (N4-méthylthiosemicarbazone), ou PTSM, est une autre molécule prometteuse dans l'évaluation de la perfusion de divers tissus avec la TEP. Elle peut être marquée avec un des radioisotopes du cuivre ($[^{64}\text{Cu}]$ -PTSM) ayant des temps de demi-vie variant de 9,7 minutes à 2,6 jours. Le $[^{64}\text{Cu}]$ -PTSM est une molécule lipophile non-chargée démontrant une haute extraction tissulaire au premier passage au niveau des organes bien perfusés (Figure 4). De plus, il y a rétention tissulaire prolongé du $[^{64}\text{Cu}]$ -PTSM (Figure 5) assurant une bonne corrélation entre la concentration régionale du radiotraceur et le taux de perfusion sanguine de cette région (GREEN *et al.*, 1990; JOHN et GREEN, 1990; SHELTON *et al.*, 1990).

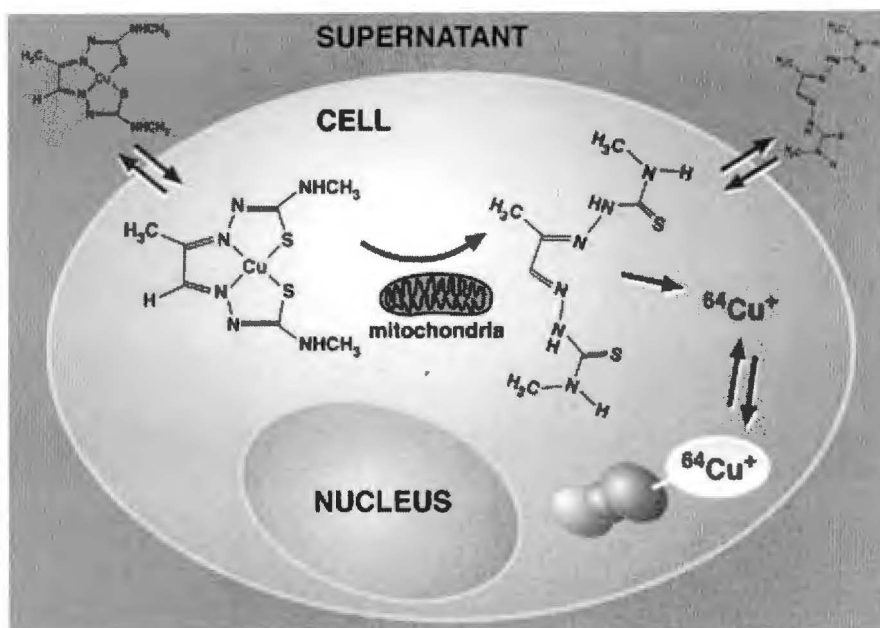


Figure 4 - Captation cellulaire du $[^{64}\text{Cu}]$ -PTSM. La molécule de $[^{64}\text{Cu}]$ -PTSM diffuse à travers la membrane cellulaire et libère ensuite l'atome de cuivre dans la cellule. Des macromolécules intracellulaires captent l'atome de cuivre réduit tandis que la molécule de PTSM quitte la cellule. Image provenant de Adonai *et al.*, 2002.

Des images du débit sanguin de haute qualité ont été obtenues avec le $[^{64}\text{Cu}]$ -PTSM dans des cerveaux de primates (MATHIAS *et al.*, 1990) ainsi que dans des cœurs (SHELTON *et al.*, 1989) et des reins (SHELTON *et al.*, 1990) de chiens. Le PTSM marqué au ^{62}Cu s'est aussi révélé prometteur en tant que radiopharmaceutique clinique basé sur un générateur dans l'évaluation de la perfusion cérébrale et myocardique (BEANLANDS *et al.*, 1992; GREEN *et al.*, 1990; WALLHAUS *et al.*, 1998). De plus, le $[^{62}\text{Cu}]$ -PTSM a déjà été employé en clinique dans la détection de maladies coronariennes (WALLHAUS *et al.*, 2001).

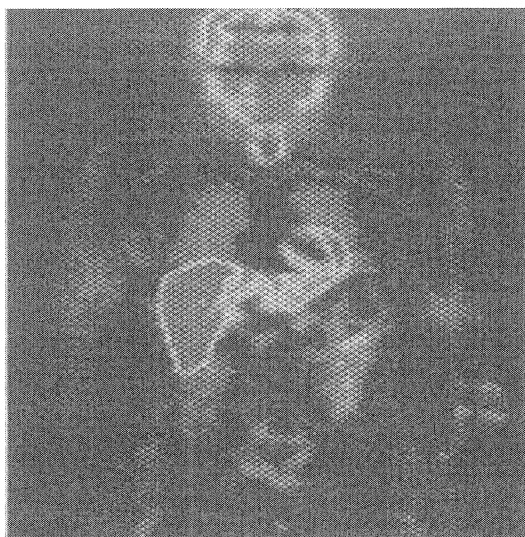


Figure 5 - Image TEP de la distribution du $[^{62}\text{Cu}]$ -PTSM chez un patient sain. Importante captation du radiotracer au niveau d'organes bien perfusés comme le cerveau, le cœur et le foie. Image provenant de Wallhaus *et al.*, 1998.

Alors même si le $[^{64}\text{Cu}]$ -PTSM s'avère être un traceur du débit sanguin convenant à l'imagerie d'organes bien perfusés tels que le cerveau, le cœur, les reins et le foie et ce, tant au niveau de la recherche que de la clinique, des études sur des rongeurs portant des tumeurs ont suggéré que le $[^{62}\text{Cu}]$ -PTSM pourrait aussi servir de traceur de la perfusion sanguine tumorale (BABICH *et al.*, 1989; MATHIAS *et al.*, 1991). En effet, les études rapportées par Mathias *et al.* montrent par biodistribution l'existence d'une corrélation entre les niveaux de $[^{64}\text{Cu}]$ -PTSM et de $[^{125}\text{I}]$ -iodoantipyrine ($[^{125}\text{I}]$ -IAP) retrouvés dans le cerveau et les tumeurs colorectales de hamsters, ce dernier traceur étant connu pour mesurer le flot sanguin tumoral. Ils ont aussi comparé le niveau de captation du $[^{64}\text{Cu}]$ -PTSM chez deux modèles de tumeurs différents, soient des implants de carcinomes colorectaux chez des hamsters et des cellules tumorales de la prostate chez des rats. Dans les deux cas, les tumeurs étaient clairement visibles sur les images et la radioactivité retenue dans les tumeurs était

constante durant l'imagerie de 30 minutes. Ils ont ensuite mesuré la perfusion tumorale avec le [^{67}Cu]-PTSM chez des chiens (MATHIAS *et al.*, 1994) et ont montré l'existence d'une corrélation linéaire avec l'emploi de microsphères radiomarquées, ces dernières représentant le standard par excellence pour confirmer des mesures du débit sanguin. Alors considérant ces résultats précliniques et une étude évaluant le [^{62}Cu]-PTSM en tant qu'agent mesurant le flot sanguin tumoral chez l'humain (WAHL *et al.*, 1993), le [^{62}Cu]-PTSM s'avère être un radiopharmaceutique prometteur dans l'étude de la perfusion sanguine tumorale à l'aide de la TEP.

I. 1. 2. 8. I. 2. 5. 2 Prolifération cellulaire

Mesurer la prolifération des cellules tumorales (Figure 6) dans le but de suivre la réponse à divers traitements contre le cancer est maintenant possible par l'imagerie TEP (PIO *et al.*, 2006). En effet, le [^{18}F] désoxy-fluorothymidine ([^{18}F]-FLT) est un nouveau traceur permettant d'étudier la réplication de l'ADN et la multiplication cellulaire (BARTHEL *et al.*, 2003; SUGIYAMA *et al.*, 2004). La thymidine étant un des constituants du matériel génétique, l'imagerie de la synthèse de l'ADN lors de la réplication des cellules est donc rendue possible avec ce radiotraceur.

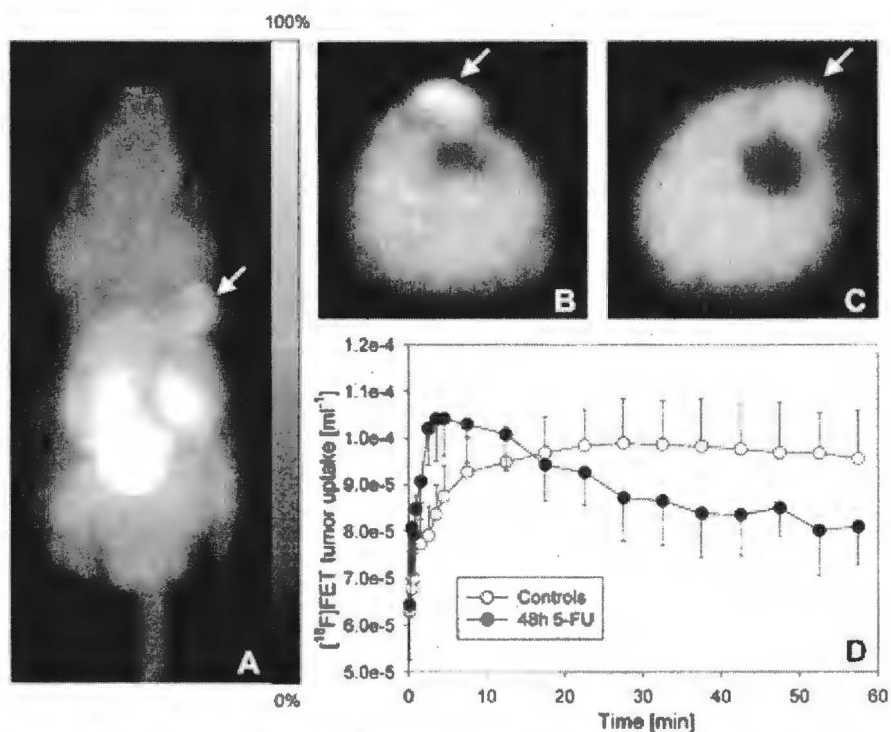


Figure 6 - Imagerie TEP de la prolifération cellulaire avec le [^{18}F]-FLT. Images TEP au [^{18}F]-FLT de souris portant des tumeurs RIF-1 réalisées 30-60 min post-injection. (A) Image corps entier d'une souris traitée au 5-fluorouracil (5-FU). (B) Image transverse chez une souris contrôle non traitée. (C) Image transverse chez une souris 48 h post-traitement au 5-FU. (D) Courbes temps-activité pour le groupe traité au 5-FU (●) et le groupe contrôle (○) ($n = 3/\text{groupe}$). Les flèches indiquent la position des tumeurs. Image provenant de Barthel *et al.*, 2003.

I. 3. Modélisation Pharmacocinétique du FDG

La modélisation cinétique constitue l'opération ultime dans une étude TEP. Elle permet de fournir les résultats de l'étude sous forme de valeurs des paramètres physiologiques tels le métabolisme du glucose ou la perfusion. Les calculs des paramètres, pour un modèle cinétique donné, ont été validés avec d'autres techniques, le plus souvent avec des biodistributions ou avec des analyses biochimiques de tissus et de sang. Les biodistributions permettent, avec des études pathologiques sur l'animal étudié, de mesurer *ex vivo* la concentration de la radioactivité dans les tissus d'intérêt.

La modélisation cinétique peut être faite à l'aide de compartiments (PHELPS *et al.*, 1979, GUNN *et al.*, 2001), ou par d'autres approches (MEIKLE *et al.*, 1998). Les modèles compartimentaux assument que la concentration du radiotracer injecté au sujet est connue en fonction du temps selon l'échantillonnage sanguin, et que ce radiotracer a subi des transformations biochimiques dans le corps. Chaque transformation du radiotracer s'exprime par un état moléculaire marqué par l'isotope. Si cet état moléculaire est rapide, il ne peut constituer par lui-même un compartiment. Généralement un bon radiotracer est celui qui est capté, retenu ou transformé par les tissus pendant un temps assez long, des dizaines de minutes, et qui ne peut se transformer que dans quelques molécules. Ces transformations, ou ces états moléculaires, représentent les compartiments. Le passage d'un compartiment à un autre est géré par des constantes de temps. Ce sont ces constantes de temps que les modèles cinétiques évaluent, et desquelles sont déduits les paramètres physiologiques.

La modélisation pharmacocinétique en TEP repose sur le fait que la molécule d'un radiotracer subit des transformations biochimiques dans l'organisme,

et que l'isotope se trouve dans une ou plusieurs de ces molécules résultantes, appelées métabolites. Chaque étape de ces transformations peut être représentée par un compartiment à condition que ces étapes varient lentement lors de la mesure TEP. En effet, si des étapes varient trop rapidement, elles ne pourront pas être détectées avec suffisamment de précision à cause de la faible statistique qui résulterait d'une acquisition TEP de trop courte durée. En outre des étapes qui auraient des temps de transformations comparables ne pourraient pas avoir leur compartiment distinct. En général un radiotraceur ne devrait pas avoir plusieurs compartiments car cela induirait une confusion potentielle dans leur statistique respective, en plus du grand nombre de paramètres à évaluer lors de l'analyse. À part la perfusion, ces paramètres représentent, majoritairement, les transformations biochimiques, c'est-à-dire les constantes de temps qui relient les compartiments.

La réponse d'un tissu après l'injection d'un radiotraceur est propre au tissu et au radiotraceur. Elle dépend tout de même des conditions et du protocole d'administration et de mesure. Malgré la considération de ces caractéristiques, les résultats varient indubitablement d'un sujet à un autre, et même chez le même sujet repris dans les mêmes conditions à des temps successifs. Cette variation est due aux facteurs biologiques et physiologiques du sujet. Et c'est pour cette raison qu'il est nécessaire de répéter les mêmes mesures dans les mêmes conditions pour obtenir une moyenne des résultats. Pour être plus précis dans l'évaluation, il est souvent recommandé de faire des mesures au repos et après activation dans les études du cœur et du cerveau.

Pour un protocole de mesure TEP donné, il est nécessaire de mesurer la quantité du radiotraceur acheminé aux tissus, et ce par l'intermédiaire d'un échantillonnage sanguin externe ou à partir des images TEP, et de mesurer la concentration de la radioactivité dans les tissus. Avec ces deux mesures, en plus d'un modèle pharmacocinétique, il est possible de calculer des paramètres physiologiques d'intérêt. Selon la molécule qui sert de radiotraceur, des paramètres physiologiques spécifiques peuvent être évalués. Nous présentons ici, seulement le modèle du FDG qui est le radiotraceur avec lequel nous avons travaillé.

Le modèle compartimental du FDG se compose des trois compartiments représentant les concentrations du radiotraceur ou de ses dérivés: le compartiment C_p où le FDG est dans le sang, le compartiment libre C_f où le FDG est dans l'espace interstitiel et le compartiment métabolisé C_m qui représente le FDG dans la cellule. Ces différents compartiments communiquent entre eux et le passage d'un compartiment à un autre est décrit par des constantes d'échange.

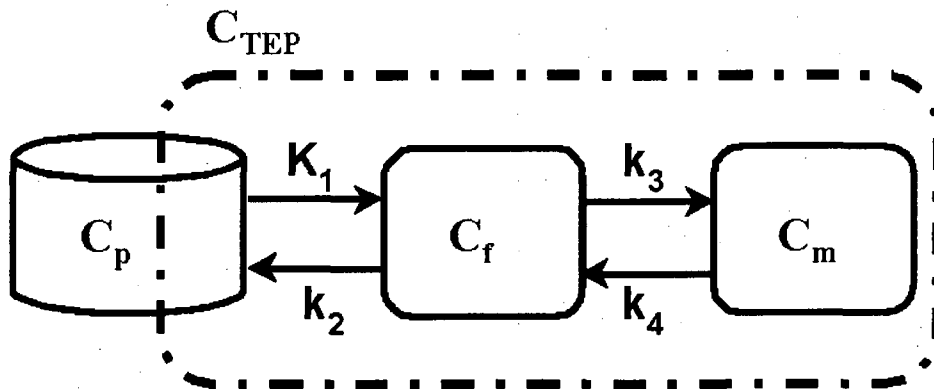


Figure 7- Modèle de trois compartiments pour décrire le comportement du FDG dans le sang (C_p), l'espace interstitiel ou libre (C_f) et le tissu (C_m).

L'évolution de la concentration du radiotraceur entre les différents compartiments est décrite par un système d'équations différentielles :

$$\frac{dC_f(t)}{dt} = K_1 * C_p(t) - (k_2 + k_3) * C_f(t) + k_4 * C_m(t)$$

$$\frac{dC_m(t)}{dt} = k_3 * C_f(t) - k_4 * C_m(t)$$

Les solutions de ce système d'équations sont données par:

$$C_f(t) = \frac{K_1}{\alpha_2 - \alpha_1} [(k_4 - \alpha_1) * \exp(-\alpha_1 * t) + (\alpha_2 - k_4) * \exp(-\alpha_2 * t)] \otimes C_p(t)$$

$$C_m(t) = \frac{K_1 * k_3}{\alpha_2 - \alpha_1} [\exp(-\alpha_1 * t) - \exp(-\alpha_2 * t)] \otimes C_p(t)$$

$C_p(t)$, appelée courbe d'entrée, est la concentration de la radioactivité dans le plasma ou dans le sang artériel. Le symbole \otimes signifie le produit de convolution. Les constantes α_1 et α_2 sont des combinaisons des constantes de temps comme suit:

$$\alpha_1 = \left[k_2 + k_3 + k_4 - \sqrt{(k_2 + k_3 + k_4)^2 - 4 * k_2 * k_4} \right] / 2$$

$$\alpha_2 = \left[k_2 + k_3 + k_4 + \sqrt{(k_2 + k_3 + k_4)^2 - 4 * k_2 * k_4} \right] / 2$$

La somme des deux compartiments $C_f(t)$ et $C_m(t)$ et une fraction k_5 de la courbe sanguine, forme la mesure TEP (M. BENTOURKIA et H. ZAIDI, 1999) que nous avons appelée C_{TEP} sur la figure 7 ci-dessus et qui est délimitée par les traits pointillés:

$$C_{TEP}(t) = \frac{K_1}{\alpha_2 - \alpha_1} [(k_3 + k_4 - \alpha_1) * \exp(-\alpha_1 * t) + (\alpha_2 - k_3 - k_4) * \exp(-\alpha_2 * t)] \otimes C_p(t) + k_5 * C_p$$

Connaissant C_{TEP} et $C_p(t)$, qui est la composante sanguine tracée directement sur l'image de la cavité du ventricule gauche, on procède à l'ajustement du modèle avec la courbe temps-activité (ou « TAC », en anglais, pour « Time Activity Curve ») obtenue à partir du tracé d'une région d'intérêt. Cette courbe TAC correspond à l'évolution temporelle du radiotraceur dans cette région d'intérêt. Cet ajustement optimisé permet de calculer les constantes K_1 à k_5 qui caractérisent les processus physiologiques. K_1 représente la perfusion et à pour unité **ml/min/g**, k_2 à k_4 sont exprimées en **min⁻¹** et représentent respectivement la constante de retour du traceur dans le sang, les constantes de phosphorylation et de déphosphorylation. Une fois ces paramètres connus, le taux de métabolisme du glucose, MRGlc, peut être calculé comme suit :

$$MRGlc(\mu\text{moles}/100\text{g}/\text{min}) = \frac{gl(\text{mg glucose}/100\text{ml Plasma}) * K_1 * k_3}{LC * 0.18(\text{mg}/\mu\text{moles}) * k_2 + k_3}$$

où **gl** est la glycémie c'est-à-dire du taux de glucose dans le sang, **LC** est la constante amalgamée (« Lumped Constant ») qui tient compte du passage du FDG par rapport au passage du glucose dans les cellules. Le facteur **0.18** au dénominateur permet de l'exprimer en **μmoles/100g/min** et provient de la conversion de 1 μmole de FDG = 0.18 mg.

I. 4. Hypothèses et Objectifs du Présent Mémoire

Étant donné que l'application de la thérapie photodynamique occasionne très rapidement des effets au niveau des tumeurs traitées, la tomographie d'émission par positrons pourrait certainement être un outil idéal pour étudier les réponses biochimiques et physiologiques au niveau des tumeurs tôt suite à ce traitement. En

effet, au niveau des études tumorales chez les rongeurs, l'imagerie TEP avec le [^{18}F]-FDG s'est avérée très utile dans la détermination de l'efficacité de la TPD et pourrait même être en mesure de fournir des informations importantes sur les mécanismes d'action de PS variés (LAPOINTE *et al.*, 1999; MOORE *et al.*, 1998). À ce sujet, des essais préliminaires ont antérieurement été réalisés avec la TEP au FDG afin d'observer des changements dans le métabolisme tumoral tôt suite à la TPD, où un scan était réalisé 30 min et 2 h après l'illumination (LAPOINTE *et al.*, 1999). L'obtention de profils de la captation tumorale du FDG a donné des indications sur les différents modes d'action des drogues utilisées en TPD, mais seulement deux scans post-illumination n'ont pas suffi à étudier de façon plus détaillée les mécanismes sous-jacents impliqués dans la mort cellulaire tumorale. En effet, puisque la cinétique de captation du FDG est relativement lente mais que les changements occasionnés par la TPD sont transitoires et assez rapides, une simple injection en bolus 30 min et 2 h après l'illumination n'a pas permis de mesurer le métabolisme du glucose dans les tumeurs et d'en détecter les changements transitoires durant et très tôt suite au traitement.

Alors dans le but d'observer les processus métaboliques transitoires se déroulant dans les tumeurs pendant et tout de suite après la thérapie photodynamique afin de comprendre plus en détail les différents modes d'action de ce traitement, la procédure de « l'imagerie TEP en temps réel » a été expérimentée. Cette procédure d'imagerie a été réalisée chez le rat en infusant de façon lente et continue le radiotracer FDG. Pendant cette période une des deux tumeurs est illuminée temporairement. Les changements dans le taux de captation du FDG observés en temps réel sont interprétés

comme étant la réponse métabolique des cellules tumorales suite au traitement, nous aidant à discriminer si les PS étudiés, soient le ZnPcS_2 et le AlPcS_4 , agissent de façon directe ou indirecte sur la mort des cellules tumorales. Cela pourrait permettre de vérifier l'implication possible du processus physiologique qu'est la stase vasculaire dans la baisse de captation du FDG observée pendant la TPD avec un PS à action indirecte comme le AlPcS_4 . Pour ce faire, des traceurs de perfusion sanguine, tels que le ^{13}N - NH_3 et le ^{64}Cu -PTSM, ont été utilisés afin de pouvoir déceler d'éventuelles variations dans le débit sanguin tumoral (BÉRARD *et al.*, 2006).

Les travaux antérieurs (BÉRARD *et al.*, 2006) ont permis de démontrer que l'imagerie TEP a le potentiel de fournir de l'information en temps réel sur divers processus physiologiques et métaboliques transitoires se déroulant *in vivo* suite à la thérapie photodynamique du cancer. L'obtention de valeurs quantitatives absolues reliées aux changements observés exigerait quant à elle la conception et la validation de modèles cinétiques appropriés (MORRIS *et al.*, 2005). Le protocole utilisé d'infusion en continue des radiotraceurs fut conçu en premier lieu pour pallier aux limitations qui existent dans la mise au point de modèles pharmacocinétiques lorsqu'il y a des injections multiples de FDG en bolus (LAPOINTE *et al.*, 1999).

L'objectif de ce projet consiste à élaborer un modèle pharmacocinétique décrivant le métabolisme tumoral durant la TPD. La Thérapie Photodynamique est mise en pratique à travers un protocole expérimental qui comporte 2 tumeurs (adénocarcinomes mammaires) implantées sur un rat. Une tumeur sera traitée tandis que l'autre servira de contrôle. Cette thérapie consiste, donc, à traiter des tumeurs

cancéreuses non profondes en injectant un produit photosensibilisant suivi, 24 h plus tard, par une illumination avec une lumière de 680 nm de longueur d'onde.

Dans ce travail nous avons utilisé la TEP et le FDG pour étudier les actions de la TPD sur les tumeurs. Nous avons d'abord appliqué le modèle compartimental du FDG, tel qu'il existe dans sa forme classique (PHELPS *et al.*, 1979) pour une injection sous forme de bolus, aux tumeurs traitée et contrôle. Malheureusement, le modèle classique ne s'applique pas aux tumeurs durant le traitement.

Dans le premier article, nous proposons de pondérer les constantes de transfert du modèle stable pour caractériser la perturbation introduite par le traitement. Cette approche paraît prometteuse pour valider les mécanismes d'action des PS. Toutefois, nous avons noté quelques limitations qui constituent un handicap pour cette méthode. Le modèle à deux populations, qui est l'objet du deuxième article, comme son nom l'indique, soutient que l'illumination se caractériserait par l'apparition d'une nouvelle population cellulaire relativement à celle de la tumeur contrôle qui servira de référence. Les paramètres engendrés par ce modèle seront ceux de ces nouvelles cellules.

II. Résultats

Les résultats de ce travail sont présentés sous forme de deux méthodes de modélisation de la TPD.

La première méthode est présentée sous forme d'un article publié comme compte-rendu de la conférence *2007 IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference* (Kinetic modeling of PET data and FDG continuous infusion in rat tumors simultaneously treated with PDT. Bentourkia, M.; Boubacar, P.; Berard, V.; van Lier, J.E.; Lecomte, R.; IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record, Volume 5, Oct. 26 2007-Nov. 3 2007, Page(s):4035 - 4039).

La deuxième méthode, est présentée sous forme d'un article publié comme compte-rendu de la conférence *2008 IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference* (PET kinetic modeling of rat tumors simultaneously treated with photodynamic therapy: A reference tissue model. Boubacar, Pate; Bentourkia, M'hamed; Sarrhini, Otman; van Lier, Johan E.; Lecomte, Roger; IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record, 2008. 19-25 Oct. 2008, Page(s): 5407 - 5411).

Résumé du premier article

La tomographie d'émission par positrons (TEP) est une technologie d'imagerie moléculaire basée sur les interactions des molécules radiomarquées au niveau de divers processus biologiques se déroulant dans un organisme.

La thérapie Photodynamique (TPD) consiste à traiter des tumeurs cancéreuses non profondes en injectant un produit photosensibilisant, i.e. AlPcS₄ et ZnPcS₂, suivi, 24 h plus tard, par une illumination avec une lumière ayant une longueur d'onde de 680 nm. Nous l'avons mise en pratique sur un modèle animal de rat portant deux tumeurs implantées en sous-cutané. Une tumeur sera traitée tandis que l'autre servira de contrôle.

Dans ce travail nous avons utilisé la TEP et le FDG pour étudier les actions de la TPD sur les tumeurs. Nous avons d'abord appliqué le modèle compartimental du FDG, tel qu'il existe dans sa forme classique pour une injection sous forme de bolus, aux tumeurs traitée et contrôle. Malheureusement, ce modèle n'a pas fourni de résultats entièrement satisfaisants pour les tumeurs traitées car la perturbation introduite par l'illumination rend ce modèle inadéquat.

Dans cet article, nous proposons de pondérer les constantes de transfert du modèle stable afin d'inclure les effets du traitement. Cette modification permet de caractériser la perturbation introduite par le traitement. Comme la courbe sanguine est aussi affectée par l'éclairage au cours de la TPD, nous l'avons calculée à partir de l'analyse factorielle. Cette modélisation paraît prometteuse pour valider les mécanismes d'action des photosensibilisateurs, en permettant notamment de faire le lien entre les états transitoires du FDG dans ses différents compartiments et le traitement.

II. 1 Kinetic modeling of PET data and FDG continuous infusion in rat tumors simultaneously treated with PDT. M'hamed Bentourkia, Paté Boubacar, véronique Bérard, Johan E. van Lier, and Roger Lecomte.

La rédaction de ce travail s'est faite entièrement sous les directives de mes directeurs de recherche. L'objectif consistait à pallier aux insuffisances constatées lors de l'étude de la thérapie photodynamique en s'aidant de l'injection d'un bolus de FDG. En effet, la cinétique du FDG étant très lente, il s'est avéré impossible de suivre les changements transitoires pendant le traitement avec un bolus, d'où l'idée de l'infusion continue. C'est cette étude avec une infusion continue que nous voulons modéliser. Pour résoudre cette problématique, nous proposons cet article qui introduit la notion de perturbation pour caractériser l'effet du traitement à travers le modèle standard du FDG.

Kinetic modeling of PET data and FDG continuous infusion in rat tumors simultaneously treated with PDT

M'hamed Bentourkia, *Member, IEEE*, Paté Boubacar, Véronique Bérard, Johan E. van Lier, and Roger Lecomte, *Member, IEEE*

Abstract— The aim of this work was to assess by kinetic modeling the effects of the photodynamic therapy (PDT) of cancer in two mammary adenocarcinoma tumors implanted in the axillary areas of rats. One tumor served as control while the other was treated with red light 24 hours after administration of two types of photosensitizers: AlPcS₄ and ZnPcS₂. PET scans were carried on, with a continuous infusion of fluorodeoxyglucose (FDG), during 2 hours including the 30 min duration of the illumination of the tumor. The usual FDG kinetic model was modified to include the effects of the treatment. Since the blood supply to the tumors was affected by the illumination during the PET scans, the input curve was derived from factor analysis. A study of the FDG kinetic compartment model and rate constants is presented for both AlPcS₄ and ZnPcS₂

I. INTRODUCTION

THE photodynamic therapy (PDT) has the potential to treat tumors with the combination of photosensitizers (PS) and light. The PSs used in this work were AlPcS₄ and ZnPcS₂. AlPcS₄ is largely transported by albumin and mainly deposited in the vascular stroma of

Manuscript received November 13, 2007. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR/IRSC). M. Bentourkia holds a scholarship from Le Fonds de La Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

tumors. It initially affects the tumor vascular system followed by indirect tumor cell death [1-3]. The photosensitizer ZnPcS_2 is preferentially transported by lipoproteins directly into tumor cells where it largely induces direct cell kill. With the appropriate kinetic modeling, the PET modality has the capability to visualize (quantify) *in vivo* the response of the tumors to the therapy, and to provide information on the tumor vascularization and metabolism during treatment. In this work we propose a new approach to investigate a step further the mechanism of action of the PDT, using a continuous infusion of fluorodeoxyglucose (FDG) and the three-compartment model [4] modified to account for the treatment during the PET scan acquisitions.

II. Theory

A. Kinetic FDG model

The three compartment FDG kinetic model (Fig. 1) [4] was the basis of the new model introduced in this work. The usual FDG kinetic model was modified to account for the tumor physiology change during the PDT treatment. The scans consisted in 120 min duration with a continuous infusion of FDG. 30 min after the start of the scan, the illumination was applied for 30 min on the tumor to be treated. The application of the illumination during the scans mainly reduces either the blood supply to the tumor or the physiologic processes in the tumor cells, when combined to AlPcS_4 or ZnPcS_2 photosensitizers, respectively. For the first part of the scan acquired before illumination, the usual FDG kinetic model was applied without modification using four rate constants K_1 - k_4 . In this usual case, a fifth value to be fitted to the data accounted for the blood

All four authors are with the Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Faculty of Medicine and Health Sciences,

volume and was called k_5 . During the second part starting from 30 min to 60 min and corresponding to the illumination period, the same rate constants of the FDG model were weighted with 4 respective weights: k_6 - k_9 . The third part of the scans consisted of a normal scanning from 60 min to 120 min, i.e. without illumination. Its behavior was different from the first part, and hence the rate constants were again weighted with 4 values: k_{10} - k_{13} . The FDG kinetic model was applied on the time-activity curves (TAC) obtained from ROIs manually drawn on the control and treated tumors. Since the rate constants vary in the three parts of the TACs, these are defined as:

$$k'_i = [k_i : k_i * k_{i+5} : k_i * k_{i+9}] \quad (1)$$

Here the square brackets and the colons indicate a concatenation of the rate constant values for the three parts of the TAC: no light, illumination, then no light. For example, the perfusion is defined as (and similarly for the other three rate constants):

$$k'_1 = [k_1 : k_1 * k_6 : k_1 * k_{10}] \quad (2)$$

Furthermore, usually a rate constant is a single value that multiplies a function. In the present expression, a rate constant is converted to a vector having same values which multiply a function at each time point. This way of notation allows to vary the value of a rate constant as expressed in (1) depending on the three parts of the TACs.

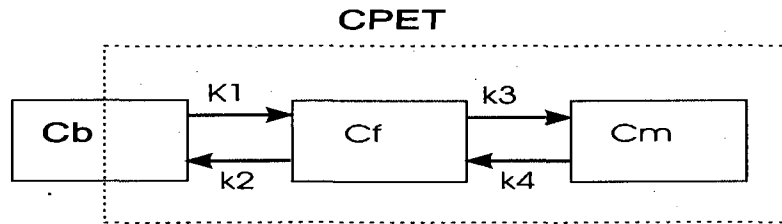


Fig. 1. The FDG kinetic model with the three compartments and four rate constants K_1 - k_4 . k_5 accounts for blood volume as represented with the part of the blood compartment (C_b) included to what the PET measures in tissue (CPET). C_f and C_m represent the free and metabolised FDG compartments. The four rate constants vary as a function of the three parts of the scan in the PDT model.

B. Input function

To apply the kinetic modeling the input function must first be defined. The input function can usually be measured by external blood sampling via an automatic counter, from a population based blood sampling, or from regions of interest drawn on the blood pool in the images. Since the tumors were implanted in the rat at the level of the heart, the images allowed us to extract a blood curve from an ROI placed on the heart. This ROI was decomposed with factor analysis [5] to determine the blood component which was used as the input curve. This procedure allowed us to fit the data from the heart obtained with an infusion of FDG during 120 min (Fig. 2). The input function determined in similar fashion was used to fit data from the tumors, but without success, since the input function extracted from the heart has a continuously rising shape, while the time-activity curves of the tumors appear to have three different steps: a slowly rising part before illumination, a plateau during illumination, and a rising part after illumination. This behavior suggests that the blood supply to the treated tumors is also subject to this variation, and the input curve should reflect it. Based on these observations and because the model doesn't fit with an input function extracted from the heart, we decomposed the ROIs around the tumors in blood and tissue components by means of factor analysis as shown in Fig. 3.

The blood component extracted from the ROI cannot be used in FDG kinetic modeling to generate absolute values for glucose metabolism, because: 1- the plasma curves are needed instead of blood curves; and 2- the blood component defined from the ROI doesn't represent the blood supply, instead it represents the blood volume in the ROI. However, and since the difference between the blood volume and the input function is an

amplification factor, we consider the blood component as the input curve, and this amplification factor will affect the value of the perfusion K_1 , without any change in the shape of the compartments functions. For an accurate use of the model with the blood function defined in the ROI, one could use the model described in [6] where the fraction of the input function in the usual model is replaced with a factor (> 1) which multiplies the blood component to retrieve the input function. In the present work, we used the blood component to comparatively study the behavior of the rate constants between tumors treated with AlPcS_4 and ZnPcS_2 .

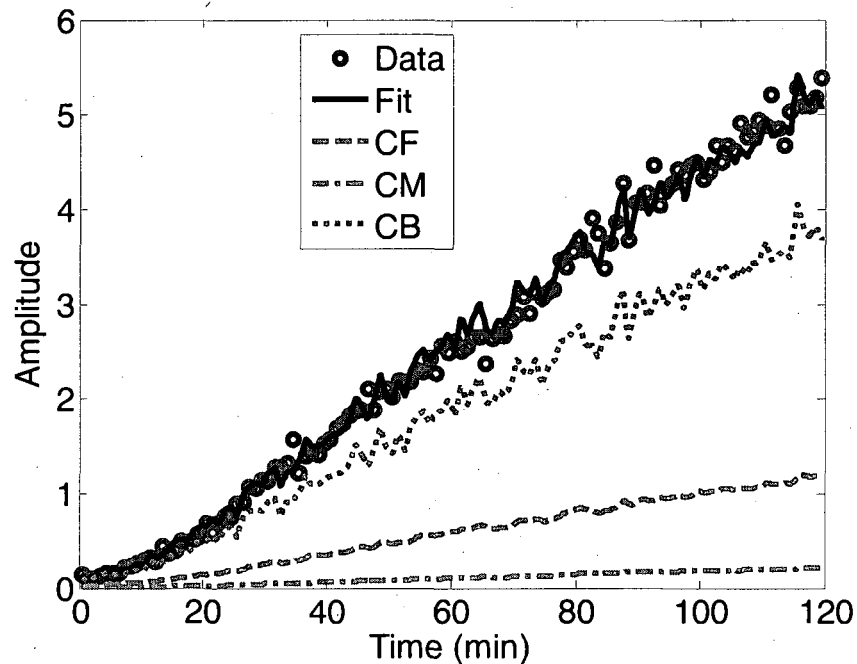


Fig. 2. FDG kinetic fit to septum TAC in normal rat heart with continuous infusion of FDG during 120 min. CF, CM and CB are free FDG, metabolized FDG and blood compartments. These blood and tissue components are to be compared with those for PDT treatment in tumors.

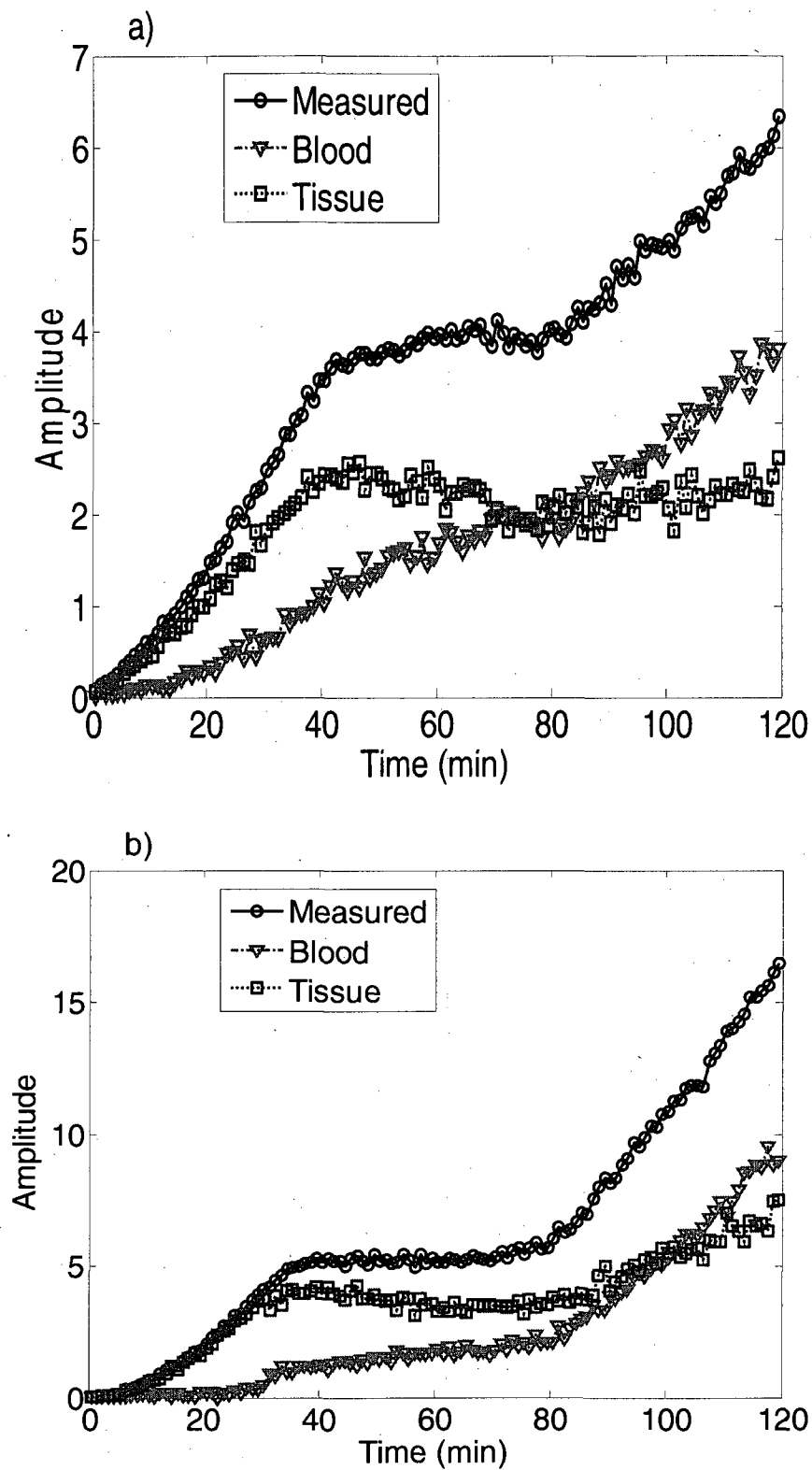


Fig. 3. Decomposition of (a) AlPcS_4 and (b) ZnPcS_2 ROIs of treated tumors with factor analysis into blood and tissue components.

III. Materials and Methods

A. Protocol of PET measurements

Approximately $2 \cdot 10^6$ tumor cells (mammary adenocarcinoma) were implanted in the axillary areas of the rats at the level of the heart. The tumors have grown till about 10 mm in size during one week before PET studies, without any apparent necrosis. The photosensitizers AlPcS₄ and ZnPcS₂ were injected 24 hours prior to the PET measurements. Dynamic PET scans were started at the same time as the FDG infusion. The measurement lasted for 2 hours. 30 min after the start of the scan, the tumor to be treated was illuminated with red light ($\lambda = 670$ nm) delivered by a diode laser through a fiber optic. The other tumor in the same rat was masked to serve as a control. The total light fluence was about 400 J/cm². The light was maintained for 30 min. Fig. 4 shows a diagram of the measurement protocol.

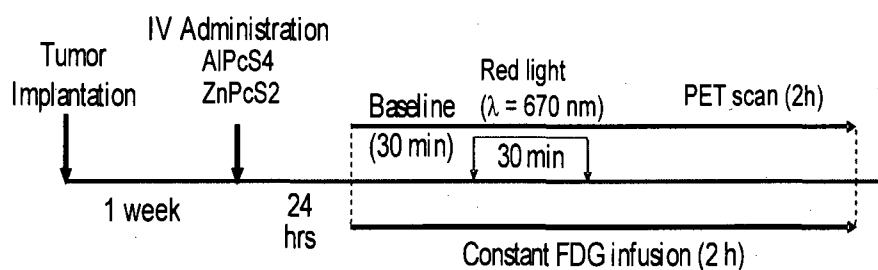


Fig. 4. Protocol of the study from tumor implantation in the rat till PET scan acquisition.

B. PET measurements

The scans were performed with the Sherbrooke small animal PET scanner in list mode [7]. The rats were anaesthetized (2.5% isoflurane in medical O₂) and canulated in the tail vein where a continuous infusion of FDG of 250 MBq in 0.96 ml solution was injected.

The data were reconstructed in 120 time frames of 60 sec each. ROIs were drawn on the tumors, both treated and control, and on the heart to extract the blood function to fit the TACs with the kinetic model as described earlier.

IV. Results

Fig. 5 displays some selected images of two rats with tumors treated with AlPcS₄ and ZnPcS₂ at the indicated times. These images were acquired in one min duration and they show the decline of the treated tumor especially with ZnPcS₂ at 60 min and above in comparison to the untreated tumor. Fig. 6 shows the time-activity curves of the control tumors with their fits and the FDG three compartments for data from AlPcS₄ in Fig. 6a and from ZnPcS₂ in Fig. 6b. These figures show slight effects of the treatment even these control tumors were masked from the light. Fig. 7 displays the fits and the FDG three compartments for the treated tumors with AlPcS₄ in Fig. 7a and for ZnPcS₂ in Fig. 7b. At 30 min when the illumination was set and a few minutes after, the effect of the treatment is still not apparent as shown in Fig. 7. This delay is also observed longer after the light was set off where the uptake of FDG starts rising only around 80 min. With the kinetic parameters generated from the fits to the TACs in Fig. 7, we built the functions for the free and metabolised FDG and the blood volume compartments, but without the weighting factors, i.e. omitting k_6 - k_{13} , to show the effects of the treatment, and the results are displayed in Fig. 8. It is seen in these figures that the blood component significantly contributes to the shape of the TACs. By using the five kinetic parameters for the usual FDG model, the data still fits the early parts of the tissue TACs as expected, since the weighting factors do not affect this part of the curve.

The four rate constants (K_1 - k_4) before the illumination, their products with their weights during the illumination (k_6 - k_9) and after illumination (k_{10} - k_{13}) are reported in Fig.9 for $AlPcS_4$ and $ZnPcS_2$. We have also included the value of the blood volume as the parameter k_5 on the figure. In this figure, the effect of the treatment can be observed in the values of k_6 - k_9 and k_{10} - k_{13} . For $AlPcS_4$, k_6 - k_9 were reduced more than those of $ZnPcS_2$ especially the k_8 , which corresponds to k_3 . After the illumination, k_{10} , which is equivalent to K_1 , highly increases in $ZnPcS_2$ in comparison to that in $AlPcS_4$.

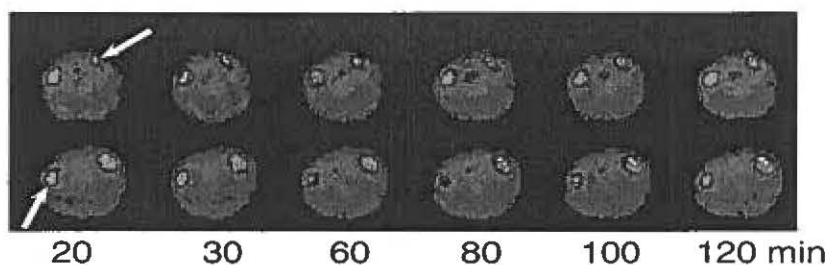


Fig. 5. A set of images of one minute duration from two rats with the tumors in the study of $AlPcS_4$ in top row, and $ZnPcS_2$ in bottom row, selected at the indicated times. The two arrows indicate the treated tumor.

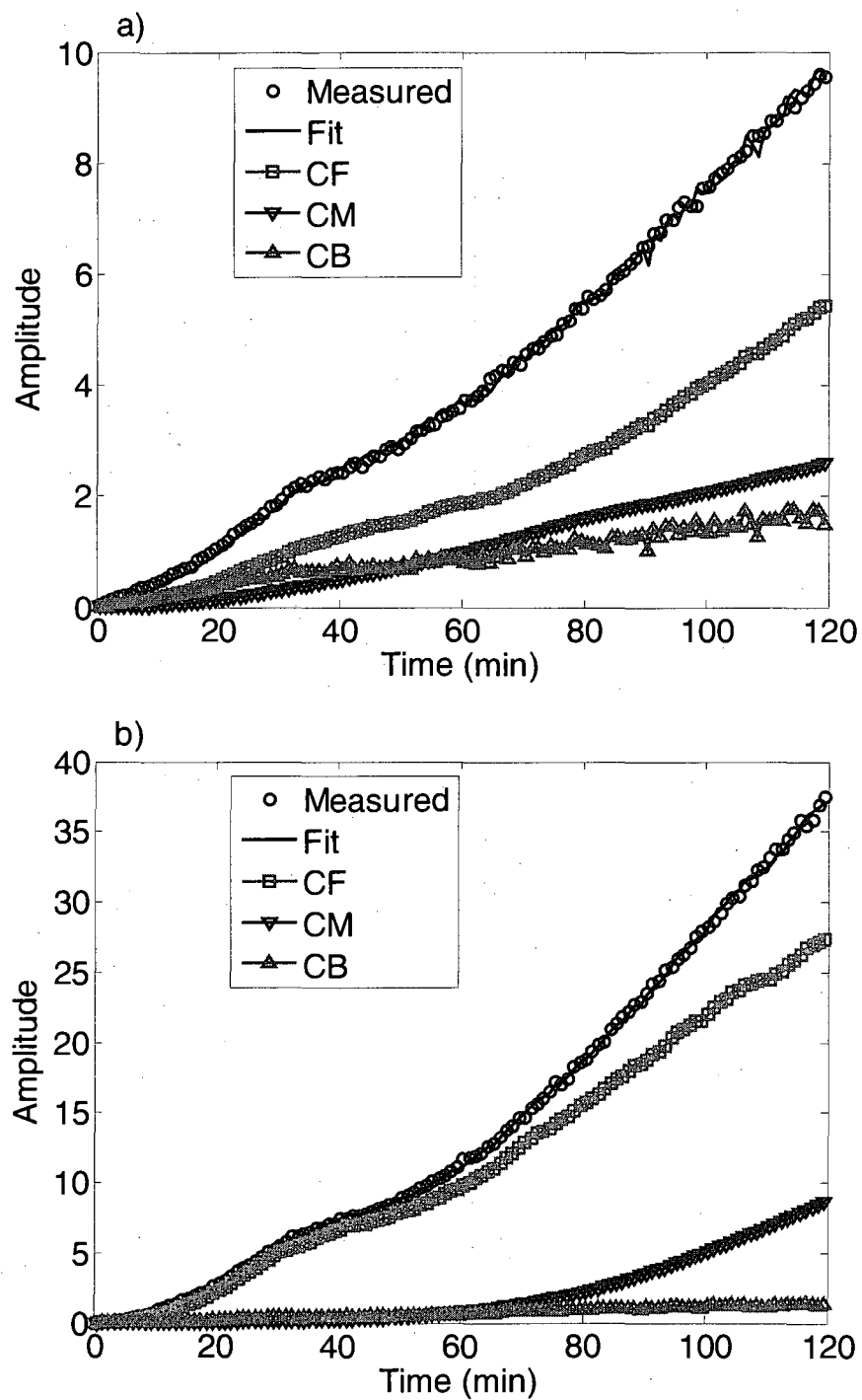


Fig. 6. FDG kinetic fit to control tumors measured with (a) AlPcS₄ and (b) ZnPcS₂.

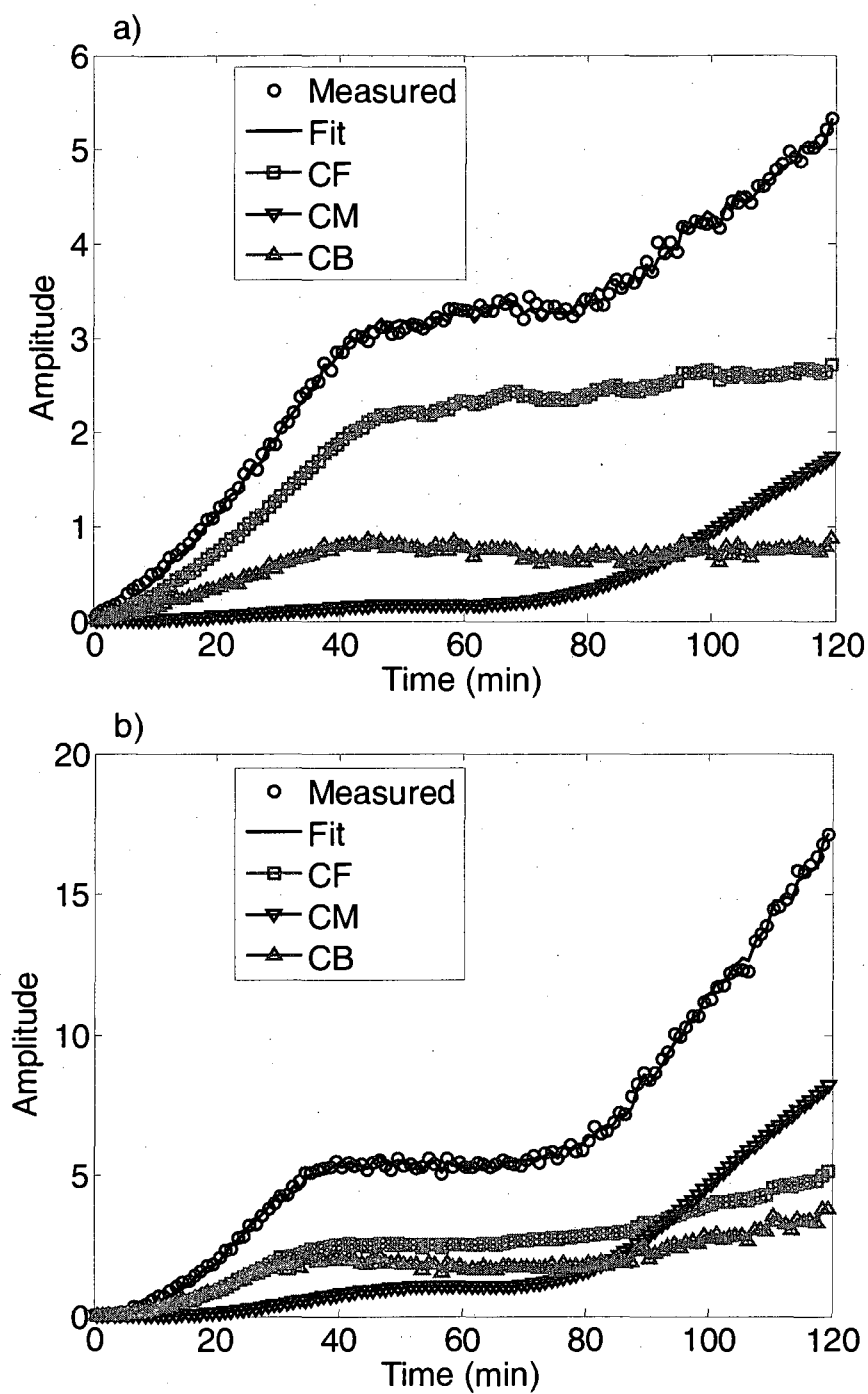


Fig. 7. FDG kinetic fit to treated tumors measured with (a) AlPcS_4 and (b) ZnPcS_2 .

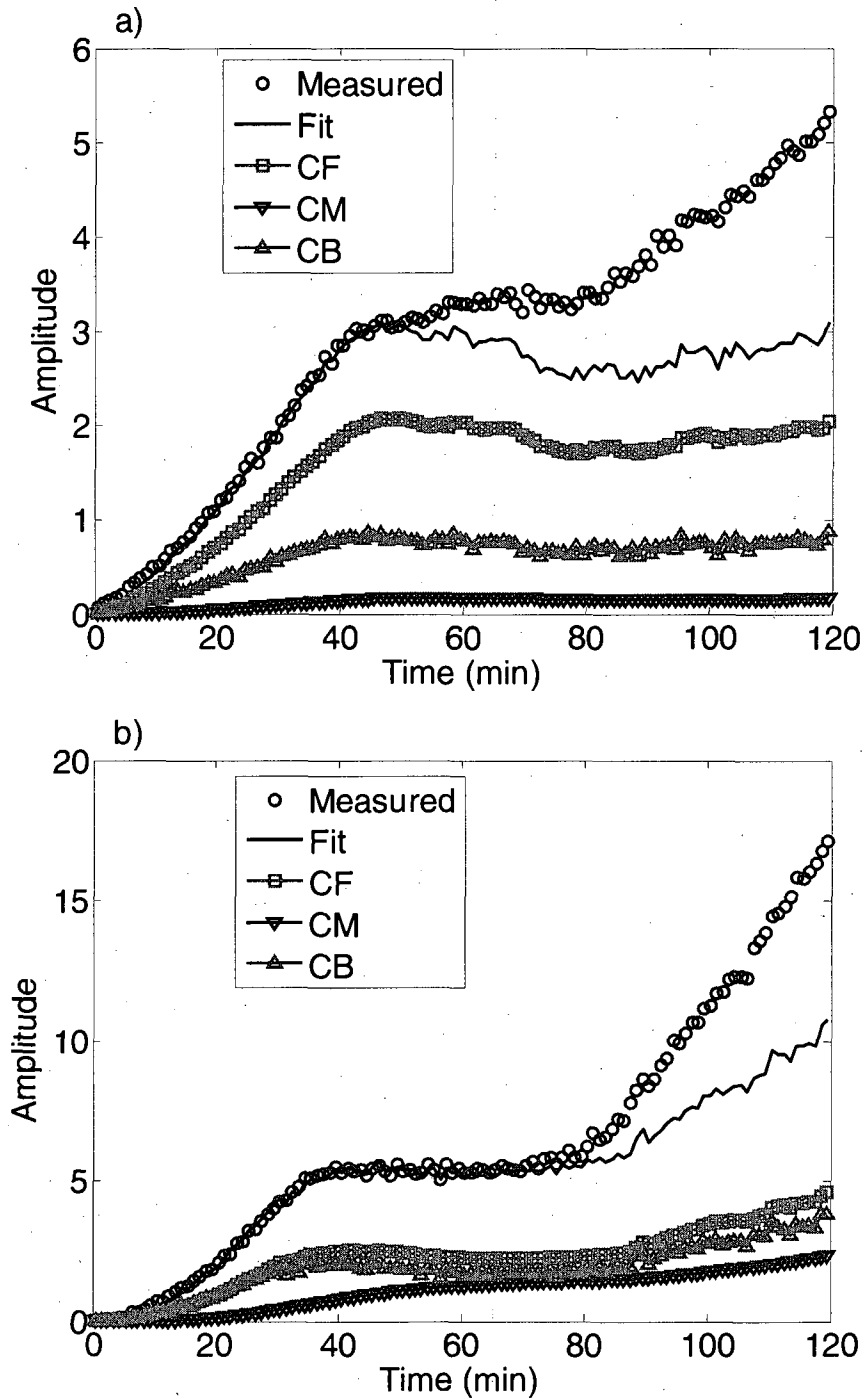


Fig. 8. FDG kinetic compartments in treated tumors measured with (a) AIPcS₄ and (b) ZnPcS₂. These functions were generated with the parameters calculated in Fig. 7 and do not include the weights to the rate constants, i.e. the fit was reproduced from the calculated K_1 - k_5 . The total curve (CF+CM+CB) illustrates the case if there were no effect of treatment in tissue.

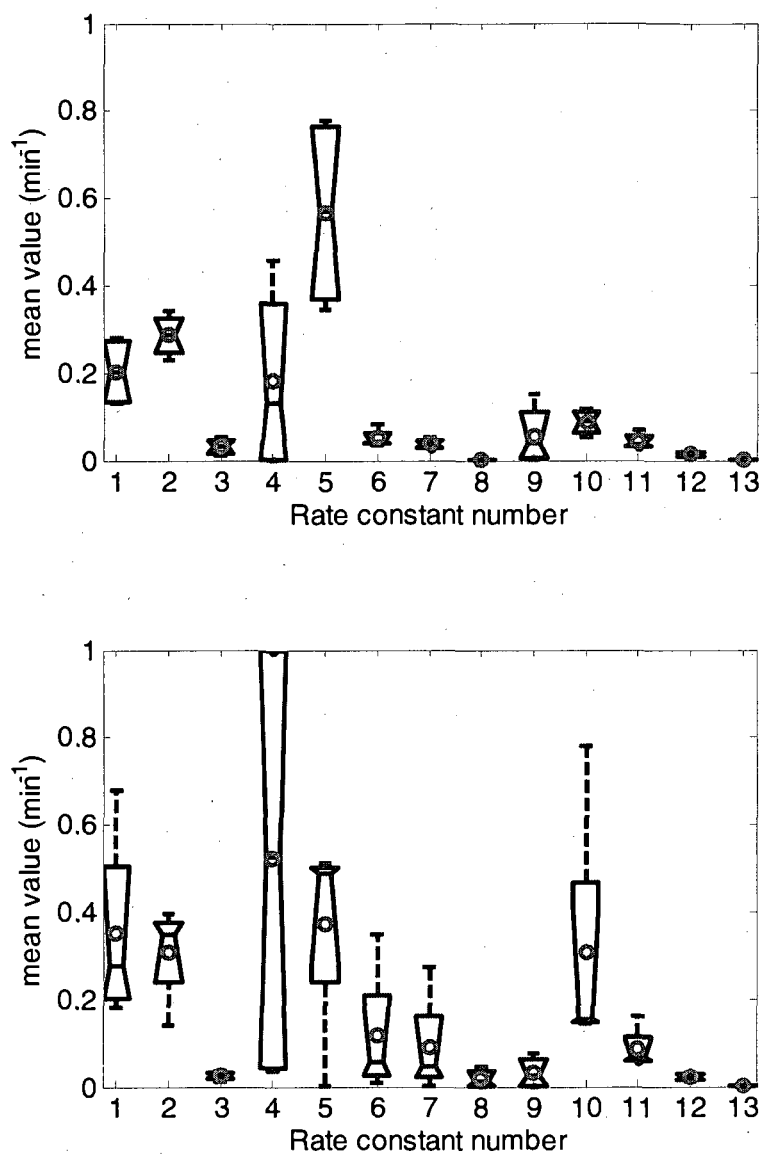


Fig. 9. Box plots of the rate constants K_1 - k_4 , the blood volume k_5 , the rate constants K_1 - k_4 multiplied with their weights during the illumination as k_6 - k_9 , and after illumination as k_{10} - k_{13} . The circles within the boxes represent the mean values and the boxes and dashed lines indicate the variation of the values. These data were obtained from 2 groups of 4 rats respectively treated with a) AlPcS_4 and b) ZnPcS_2 .

V. Discussion

The photosensitizer ZnPcS_2 readily localizes in tumor cells after intravenous injection, while AlPcS_4 remains in the tumor vascular compartment. PDT with ZnPcS_2 impairs mitochondrial and other intracellular membrane systems, resulting in direct tumor cell kill, whereas PDT with AlPcS_4 damages tumor blood vessels, interrupting the supply of oxygen and nutrients, resulting in indirect tumor cell death [8],[9].

The combination of tumor treatment and dynamic PET imaging using continuous radiotracer injection to observe the tumor response to treatment in real time is a challenging task. The tumors, without necrosis, continuously accumulate FDG for their metabolism. Even with a continuous infusion during two hours, the time activity curve of the tumors continuously rises (Fig. 6). This study is an attempt to investigate the effects of the two photosensitizers in the tumors by means of compartment modeling. By fitting the tumor TACs with an appropriate kinetic model, the rate constants and the free FDG compartment and the metabolised FDG compartment could help to investigate the action of the photosensitizers.

Before applying the modified kinetic model to the tumors, the usual FDG compartment model was applied to PET data acquired with FDG in the heart of a normal rat, with the same protocol as for the rats with tumors. To fit the tumor TACS, the input curves were extracted by means of factor analysis from ROIs drawn on the tumors, since the input curves derived from the heart didn't allow the model to fit the data, because, a priori, the blood supply to the tumors varies during the illumination of the tumors. As a result, an input curve derived from the blood pool doesn't reflect the shape nor the amplitude of the blood supplied to the tumors. By using the input curves defined with factor analysis,

although the amplitude was not accurate, the model was able to nicely fit the data. The uncertainty on the amplitude of the input curve is expected to be compensated by a corresponding increase of the K_1 value. Nevertheless, the rate constant values calculated here are only for comparison while using the same protocol of measurements and the same data analysis methods. For the present study, we defined the blood component extracted with factor analysis as the one having low counts in the early part of the tumor TAC, i.e. before illumination, based on the hypothesis that in the tumor there is more FDG in the tissue than in the blood. The modified FDG model was also applied in the control tumors with a blood function extracted from an ROI drawn around the tumors. The tumors, even masked from the light, showed some systemic effect paralleling the treated tumor behavior resulting from the treatment.

In this model, we let the rate constant k_4 to vary and the model returned relatively high k_4 values (Fig. 9) considering that the tumors are likely to accumulate FDG even it cannot be used as a fuel. The continuous infusion of FDG might saturate as FDG-6p, forcing FDG-6p to recombine back into FDG irrespective of the state of the tumor cells. Still from Fig. 9, the five parameters K_1 - k_5 in Fig. 9a and 9b depend on the states of tumors before treatment, while K_6 - k_9 reflect the effect of the treatment where the four rate constants (corresponding to K_1 - k_4) were more affected in AlPcS₄ than in ZnPcS₂ resulting in a more change in the shape of the TACs with ZnPcS₂ than with AlPcS₄. In the last part of the TACs, K_{10} (corresponding to the perfusion K_1) was higher in ZnPcS₂ than in AlPcS₄ suggesting an increase of the supply of FDG to the tumor where the TAC rises sharply after illumination. These observations indicate that the tumor cells partially or totally reduce utilising FDG during the illumination, while they regain in activity after the

illumination, but in this time differently for AlPcS₄, low activity, and for ZnPcS₂ which has a high activity as reflected by the value of k_{10} (Fig. 9b) and the shape of the TAC (Fig. 7b) [3]. In other words, the slow regain of activity in the tumors treated with AlPcS₄ might be due the lack of blood supply, while those treated with ZnPcS₂, even with a hypothetical reduction of the number of cells, these are again well perfused and continue to metabolise FDG.

The main finding in this work was the determination of the part of the TAC, corresponding to the treatment, with a single set of rate constants (k_6 - k_9) even the light was set on for 30 min. This means that the effect of the light on the tumors is short in time, about 10 min or less as can be seen in the response of the tumors to light in Fig. 7, and the illumination for a longer duration (30 min) has no effect. Usually, to destroy a tumor, it is more efficient to split the dose at several specific times. In a future work, we expect the PDT treatment to be more efficient if we illuminate the tumors during about one min repeated several times at regular intervals. The PET instrument will be of great help in assessing these timings.

VI. Conclusions

Since the photosensitizers AlPcS₄ acts on the tumor blood supply and ZnPcS₂ directly affects the tumor cells, we expect that the FDG compartmental study could provide more insight into the action mechanisms of these two photosensitizers. The combination of the PET measurement with the PDT treatment requires new approaches in kinetic modeling to take into account the perturbation to the measured structures introduced during the PET measurements. We have shown that an input function derived from sampling or from other sites than the tumors is not appropriate as it doesnot reflect the perturbation

affecting the blood supply to the tumors. Also the PET imaging was shown to be potentially used in assessing the appropriate therapy protocol.

REFERENCES

- [1] W. S. Chan, N. Brasseur, C. La Madeleine, J. E. van Lier, "Evidence for different mechanisms of emt-6 tumor necrosis by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or Photofrin: tumor cell survival and blood flow," *Anticancer Res.*, 16:1887-1892, 1996.
- [2] W. S. Chan, N. Brasseur, C. La Madeleine, R. Ouellet, J. E. van Lier, "Efficacy and mechanism of aluminium phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours," *Eur J Cancer*, 33:1855-1859, 1997.
- [3] V. Bérard, J. Rousseau, J. Cadorette, L. Hubert, M. Bentourkia, J. E. van Lier, R. Lecomte, "Dynamic Imaging of Transient Metabolic Processes by Small Animal Positron Emission Tomography for the Evaluation of Photosensitizers in Photodynamic Therapy of Cancer," *J. Nucl. Med.*, 47:1119-1126, 2006.
- [4] M. E. Phelps, S. C. Huang, E. J. Hoffman, C. Slin, L. Sokoloff, D. E. Kuhl, "Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-d-glucose: validation of method," *Ann Neurol.*, 6:371-88, 1979.
- [5] M. Bentourkia, D. Lapointe, V. Selivanov, I. Buvat, R. Lecomte, "Determination of Blood Curve and Tissue Uptake from Left Ventricle Using FADS in Rat FDG-PET Studies," *IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference*, NSS-MIC Sessions, M06-005 ; 1999.
- [6] M. Bentourkia, "Kinetic modeling of PET data without blood sampling," *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, vol. 52, no. 3, pp. 697-702, 2005.
- [7] R. Lecomte, J. Cadorette, S. Rodrigue, D. Lapointe, D. Rouleau, M. Bentourkia, R. Yao, and P. Msaki, "Initial results from the Sherbrooke avalanche photodiode positron tomograph," *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, vol. 43, pp. 1952-1957, 1996.
- [8] C. Milanesi, C. Zhou, R. Biolo, G. Jori, "Zn(II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumours. II. Studies on the mechanism of photosensitised tumour necrosis," *Br. J. Cancer.*, 61:846-850, 1990.
- [9] J. E. van Lier, J. D. Spikes, "The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines," *Ciba Found Symp.*, 146:17-32, 1989.

Résumé du deuxième article

Dans l'article 1, nous avons voulu démontrer que pondérer les paramètres de transfert pour caractériser l'effet du traitement était réaliste. Mais nous avons été confrontés à la difficulté de valider, sur des systèmes stables, ce modèle dédié essentiellement à des systèmes instables. En effet, nous avons pensé que la perturbation était inhérente à ce modèle et qu'il fallait, si on voulait l'appliquer à un système stable, trouver un facteur de correction qui symboliserait la quantité de perturbation introduite lorsque le système n'était pas perturbé.

Le modèle à deux populations, qui est le sujet de ce deuxième article, est inspiré du modèle, dit modèle 6K, établi initialement pour une tumeur hétérogène. Ce modèle suppose que dans une tumeur il y'a deux types de cellules : des cellules saines et des cellules cancéreuses. Ces deux populations sont à des proportions complémentaires. On modélise chacune de ces populations par le modèle compartimental du FDG. Le modèle utilise une région de référence, pour représenter les cellules saines, qui ne nécessite pas d'être modélisée, ce qui revient simplement à modéliser les cellules tumorales.

II. 2 PET Kinetic Modeling of Rat Tumors Simultaneously Treated with Photodynamic Therapy: a Reference Tissue Model. Paté Boubacar, M'hamed Bentourkia, Johan E. van Lier, Otman sarrhini and Roger Lecomte.

La rédaction de ce travail s'est faite entièrement sous les directives de mes directeurs de recherche. L'objectif consistait à pallier aux insuffisances constatées lors de l'étude de la thérapie photodynamique en s'aidant de l'injection d'un bolus de FDG. En effet, la cinétique du FDG étant très lente, il s'est avéré impossible de suivre les changements transitoires pendant le traitement avec un bolus, d'où l'idée de l'infusion continue. C'est cette étude avec une infusion continue que nous voulons modéliser. Pour résoudre cette problématique, nous proposons ce deuxième article qui introduit la notion des deux populations dans le sens où on supposerait que l'effet du traitement va se matérialiser par l'apparition de cette nouvelle classe de cellules que nous allons modéliser.

PET Kinetic Modeling of Rat Tumors Simultaneously Treated with Photodynamic Therapy: a Reference Tissue Model

Paté Boubacar, M'hamed Bentourkia, *Member, IEEE*,
Otman Sarrhini, Johan E. van Lier, and Roger Lecomte, *Member, IEEE*

Abstract— The aim of this work was to assess by kinetic modeling the effects of the photodynamic therapy (PDT) of cancer in two mammary adenocarcinoma tumors implanted in the axillary areas of rats. One tumor served as control while the other was treated with red light 24 hours after administration of two types of photosensitizers (PS): AlPcS₄ and ZnPcS₂. PET scans were carried on, with a continuous infusion of fluorodeoxyglucose (FDG), during 2 hours including the 30 min duration of the illumination of the tumor. Images were reconstructed in 120 frames of 60 sec each. A reference-region kinetic model or 6k-model was introduced to include the effects of the treatment. Since the blood supply to the tumors was affected by the illumination during the PET scans, the input curve was derived from factor analysis. A study of the FDG kinetic compartment model and rate constants is presented for both AlPcS₄ and ZnPcS₂.

I. INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) has the potential to treat tumors with the combination of photosensitizers (PS) and light. Most clinical applications of PDT use porfimer sodium

but a second generation of PS have been developed. In this work, the PS used are aluminium phthalocyanine trisulfonated AlPcS₄, known to affect the tumor vascularization system, and zinc phthalocyanine disulfonated ZnPcS₂, known to directly kill the cells. The relative contribution of the 2 main pathways to overall tumor response depends on the distribution of photosensitizer among cellular or vascular compartments, which in turn depends on the nature of the photosensitising drug [1-8]. The results of many studies of PDT in rodents have provided evidence for 2 types of response mechanism that lead to tumor regression [9, 10].

The goal of this work was to explore the relevance of coupling ¹⁸F-FDG-PET and PDT to evaluate the role of the PS in the mechanisms of tumor response to treatment in real time.

Photosensitizers

Photodynamic therapy is a treatment which combines tumor-localizing PS and light to induce damage to tumor. Sulfonated Al and Zn phthalocyanines demonstrate favorable physico-chemical and spectral properties for use as PS. Some of them are undergoing clinical trials [5]. AlPcS₄ resides in the vascular stroma and induces tumor destruction via damage to vascular structures, while ZnPcS₂ directly acts on tumor cells [6].

The continuous infusion-protocol

Dynamic imaging performed after a bolus injection of the tracer had limitations because changes are transient or represent rapid alterations in the underlying physiology, in which case the relatively slow kinetics of the tracer can mask the true behavior of the system under study. Because the metabolic changes associated with these transient effects

are concurrent with the kinetics of ^{18}F -FDG uptake, it is extremely difficult to extract the true contribution to the uptake from each factor. Further, the slow kinetics of ^{18}F -FDG uptake do not allow an instantaneous measurement of glucose metabolism from a single bolus injection.

Infusion protocols have been used to study transient changes in physiology, particularly in neuroimaging applications. The interactions between receptors in the brain and exogenous drugs and endogenous neurotransmitters have been studied using competition with a radioligand. The slow infusion of the radioligand allowed investigators to study the interaction at the receptor binding site dynamically [11]. Studies on mice have demonstrated that, using a single-scan infusion protocol, imaging can detect direct competition at the receptor with an antagonist [12].

II. Theory

A. Kinetic FDG model

The compartmental 4k-model was originally developed for a localized region of tissue that is homogeneous with respect to the rate of blood flow, the transport of glucose and FDG, and the glucose and FDG concentration in tissue [13]. As tumors grow, the relative distribution of vascular structures, stroma and necrotic tissue add complexity to the tumor FDG kinetics. Some solutions were proposed, such as taking into account heterogeneity of tissues and using 6k models [14], which incorporate the normal tissue and provide the kinetic parameters for the tumor cells.

In a previous study in our laboratory, we modified the usual FDG kinetic model to take into account the effect of the PDT treatment [15]. For the first part of the scan acquired before illumination, the usual FDG kinetic model was applied without

modification using four rate constants K_1 - k_4 . In this usual case, a fifth value to be fitted to the data accounted for the blood volume and was called k_5 . During the second part starting from 30 min to 60 min and corresponding to the illumination period, the same rate constants of the FDG model were weighted with 4 respective weights: k_6 - k_9 . The main finding in this study was that the effect on the tumors is nearly instantaneous at the moment of the application of the light, and the illumination for a longer duration (30 min) has no effect. In this case, the standard approach for evaluating FDG-PET kinetic studies is based upon an assumption that the tissue within a representative region of interest (ROI) is relatively homogeneous in terms of FDG kinetics. In neoplasms and other disease states, the tissue within an ROI may be grossly heterogeneous, due to adjacent infarcted tissue and other causes. The model currently used to analyze FDG kinetic studies of tumors is the 6k-model originally developed by Wu *et al.* [14]. This 6k-model was an adapted model of three-compartment model originally developed by Phelps *et al.* [13].

The 6k-model was a method employing two ROIs (one over the tumor and another over a "reference region") to deal with this level of heterogeneity. In case of our studies, the two ROIs are the treated tumor and the control tumor. The direct application of this "homogeneous" 6k-model to the treated tumor kinetic studies can produce misleading results because of the treatment effect. But this method provides the kinetic data uniquely contributed by the tumor cells in the lesions so we made some modifications on the 6k-model to take into account the perturbation introduced by the photodynamic therapy (Fig. 1).

The scans duration was 120 min with a continuous infusion of FDG. Thirty min after the start of the scan, the illumination was applied for 30 min on one tumor. The application of the illumination during the scans mainly reduces either the blood supply to the tumor or the physiologic processes in the tumor cells, when combined to AlPcS₄ or ZnPcS₂ PS, respectively. For the first part of the scan acquired before illumination, the usual FDG kinetic model was applied without modification using four rate constants K₁-k₄. In this usual case, a fifth value to be fitted to the data accounted for the blood volume and was called k₅. During the second part starting from 30 min to 60 min and corresponding to the illumination period, the use of FDG in control and treated tumors behaves differently. By normalising the pre-illumination part of the control tumor time-activity curve (TAC) to that of the treated tumor (early 30 min of the scan), which depends on the cellular density and their vascularisation in the tumors, the density of the cells that do not phosphorylate FDG during the illumination can be assessed through a model reflecting the cellular survival. Although the cells are not destroyed by either of the two PS as evidenced in the third part of the TAC post-illumination, the model accurately accounts for the deficit in FDG uptake during the illumination.

The model is assumed in eq. (1) and corresponding to Fig.1 below:

$$C_{pet} = w_1(t) * (C_f(t) + C_m(t)) + C_{bl} + (1 - w_1(t)) * (C_{ref} - C_{bR})$$

$$w_1(t) = \begin{cases} 0 & \text{si } t \leq 30 + \Delta_1 \\ \exp(-\alpha * (t_{start} + \Delta_1 : t_{end} + \Delta_2)) & \\ \exp(-\alpha * (t_{end} + \Delta_2 : t_{es})) & \end{cases}$$

Here C_{pet} is the measured concentration of FDG in the treated tumor, C_f and C_m are the free and metabolized radiotracer compartments, C_{ref} are the measured counts in control tumor normalized to the early part of treated tumor TAC where they normally overlap,

C_{bt} and C_{br} are the vascular counts in treated and control tumors, and w_1 is the relative weight of the responding cells to the treatment in the treated tumor. $w_1(t)$ is expressed as a function of time and depends on the three parts of the scan: before illumination, during illumination from t_{start} till t_{end} , and after end of illumination t_{end} till end of scan t_{es} . Note that the cells do not promptly respond to the effects of illumination, they naturally present a delay expressed with Δ_1 and Δ_2 .

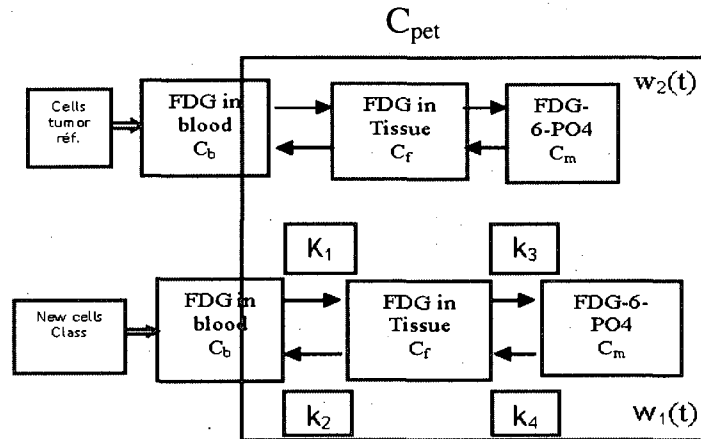


Fig. 1. Schematic diagram of 2 ROIs, 8K model. In tumor tissue, two cell populations are assumed. Each occupies w_1 and w_2 of percent mass weight. K_1 , k_2 , k_3 , k_4 are the first order rate constants of the new cell population.

This model assumes that prior to the start of illumination, the two tumors have the same type of cell population. From the moment the illumination is started, it is assumed that a new class of cells appears which are in principle different from those before illumination. The emergence of this new class of cells would be following the model of cell survival after radiotherapy treatment. The two classes of cells are evidenced by comparing the normalised TAC of the control tumor cells to the TAC of the treated tumor cells.

The population of these cells is expected to increase during the illumination. Thus, at any given moment during the illumination, the cell population of tumor treated will be equal to the sum of cells in the tumor control and new cells emerged because of the illumination. Both terms are weighted by the proportions of these cells.

According to the 8K model, the total amount of tracer in tumor tissue, C_{pet} , is equal to the sum of tracer concentrations in the control tumor cell population (C_{ref}), and the tracer concentration in the new treated cells.

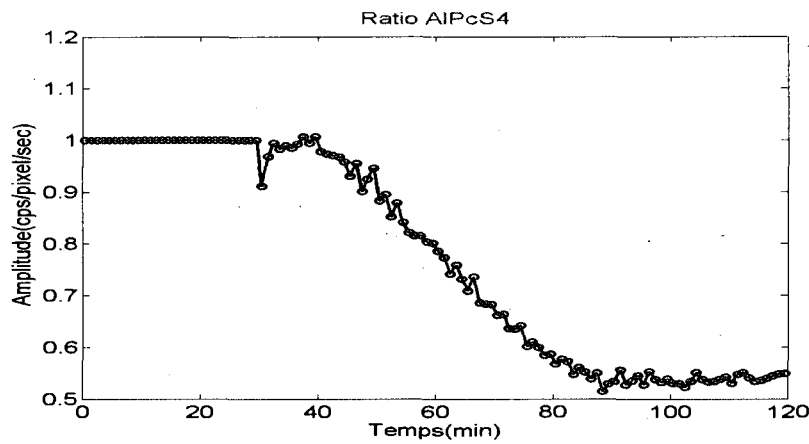


Fig. 2. Ratio between the treated and control TACs with AlPcS₄.

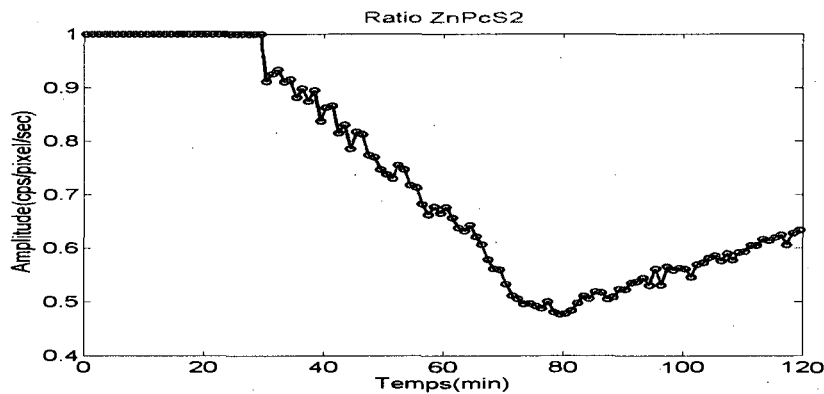


Fig. 3. Ratio between the treated and control TACs with ZnPcS₂.

B. Input function

To apply the kinetic modeling the input function must first be defined. The input function can usually be measured by external blood sampling via an automatic counter, from a population based blood sampling, or from ROIs drawn on the blood pool in the images. Since the tumors were implanted in the rat at the level of the heart, the images allowed us to extract a blood curve from ROIs placed on the heart. This ROI was decomposed with factor analysis [14] to determine the blood component which was used as the input curve. This procedure allowed us to fit the data from the heart obtained with an infusion of FDG during 120 min (Fig. 4). The input function determined in similar fashion was used to fit data from the tumors, but without success, since the input function extracted from the heart has a continuously rising shape, while the TAC of the tumors appear to have three different steps: a slowly rising part before illumination, a plateau during illumination, and a rising part after illumination. This behavior suggests that the blood supply to the treated tumors is also subject to this variation, and the input curve should reflect this. Based on these observations and because the model does not fit with an input function extracted from the heart, we decomposed the ROIs around the tumors in blood and tissue components by means of factor analysis as shown in Fig. 5.

The blood component extracted from the ROI can not be used in FDG kinetic modeling to generate absolute values for glucose metabolism, because: 1- the plasma curves are needed instead of blood curves; and 2- the blood component defined from the ROI does not represent the blood supply, instead it represents the blood volume in the ROI. However, and since the difference between the blood volume and the input function is an amplification factor, we consider the blood component as the input curve, and this

amplification factor will affect the value of the perfusion K_1 , without any change in the shape of the compartments functions. For an accurate use of the model with the blood function defined in the ROI, one could use the model described in [17] where the fraction of the input function in the usual model is replaced with a factor (> 1) which multiplies the blood component to retrieve the input function. In the present work, we used the blood component to comparatively study the behavior of the rate constants between tumors treated with AlPcS_4 and ZnPcS_2 .

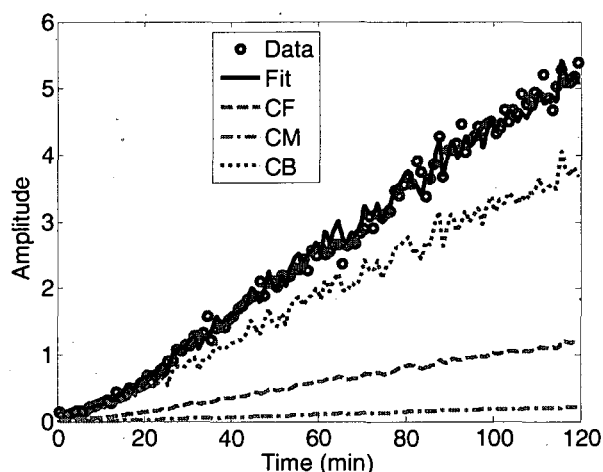


Fig. 4. FDG kinetic fit to septal time-activity curve in normal rat heart with continuous infusion of FDG during 120 min. CF, CM and CB are free FDG, metabolized FDG and blood compartments. These blood and tissue components are to be compared with those for PDT treatment in tumors.

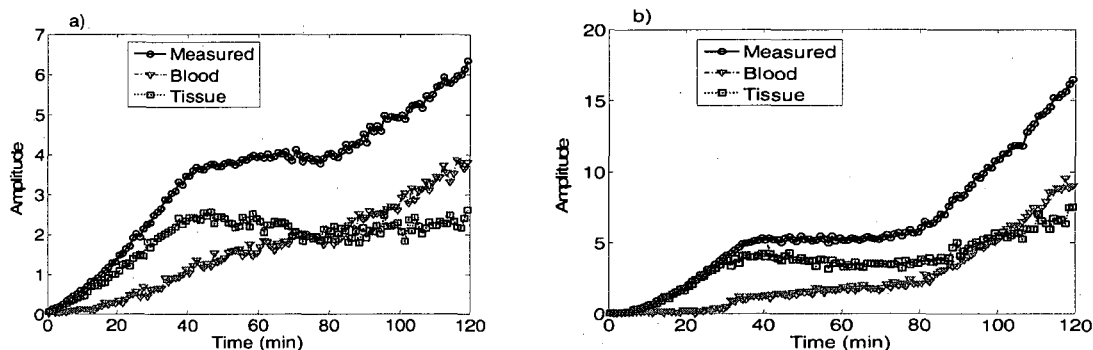


Fig. 5. Decomposition of (a) AlPcS_4 and (b) ZnPcS_2 TACs of treated tumors with factor analysis into blood and tissue components.

III. Materials and Methods

A. Protocol of PET measurements

Approximately $2 \cdot 10^6$ tumor cells (mammary adenocarcinoma) were implanted in the axillary areas of the rats at the level of the heart. The tumors grow to about 10 mm in size during one week before PET studies, without any apparent necrosis. The PS AlPcS₄ and ZnPcS₂ were injected 24 hours prior to the PET measurements. Dynamic PET scans were started at the same time as the FDG infusion. The measurement lasted for 2 hours. Thirty min after the start of the scan, one tumor was illuminated with red light ($\lambda = 670$ nm) delivered by a diode laser through a fiber optic. The other tumor in the same rat was masked to serve as a control. The total light fluence was about 400 J/cm². The light was maintained for 30 min. Fig. 4 shows a diagram of the measurement protocol.

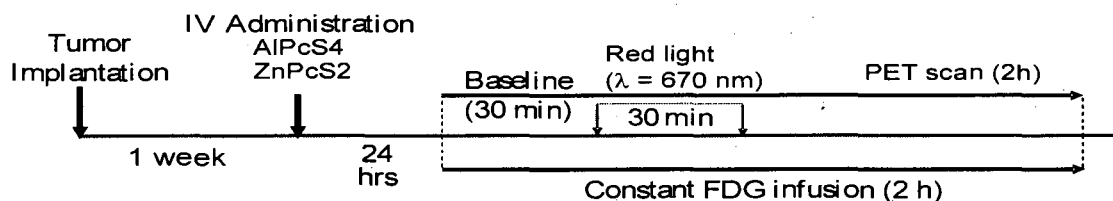


Fig. 6. Protocol of the study from tumor implantation in the rat till PET scan acquisition.

B. PET measurements

The scans were performed with the Sherbrooke small animal PET scanner in list mode [18]. The rats were anaesthetized (2.5% isoflurane in medical O₂) and canulated in the tail vein where a continuous infusion of FDG of 250 MBq in 0.96 ml solution was

injected. The data were reconstructed in 120 time frames of 60 sec each. ROIs were drawn on the tumors, both treated and control, and on the heart to extract the blood function to fit the TACs with the kinetic model as described earlier.

IV. Results

Fig. 7 displays some selected images of two rats with tumors treated with AlPcS_4 and ZnPcS_2 at the indicated times. All these images were acquired in one min duration and they show the decline of the activity in treated tumor especially with ZnPcS_2 at 60 min and above in comparison to the untreated tumor. Figs. 8 and 9 show the time-activity curves of the control and treated tumors with their fits for AlPcS_4 and ZnPcS_2 , respectively. Fig. 10 shows the rate constants k_1 - k_4 in control and treated tumors.

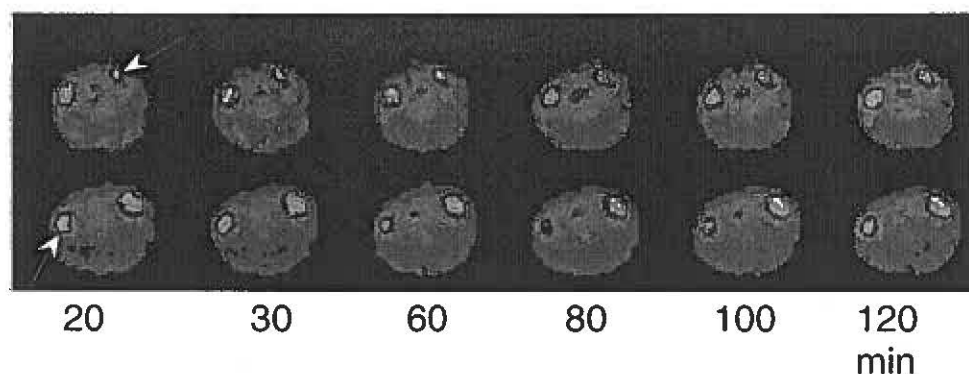


Fig. 7. A set of images of one minute duration from two rats with the tumors in the study of AlPcS_4 in top row, and ZnPcS_2 in bottom row, selected at the indicated times. The two arrows indicate the treated tumor.

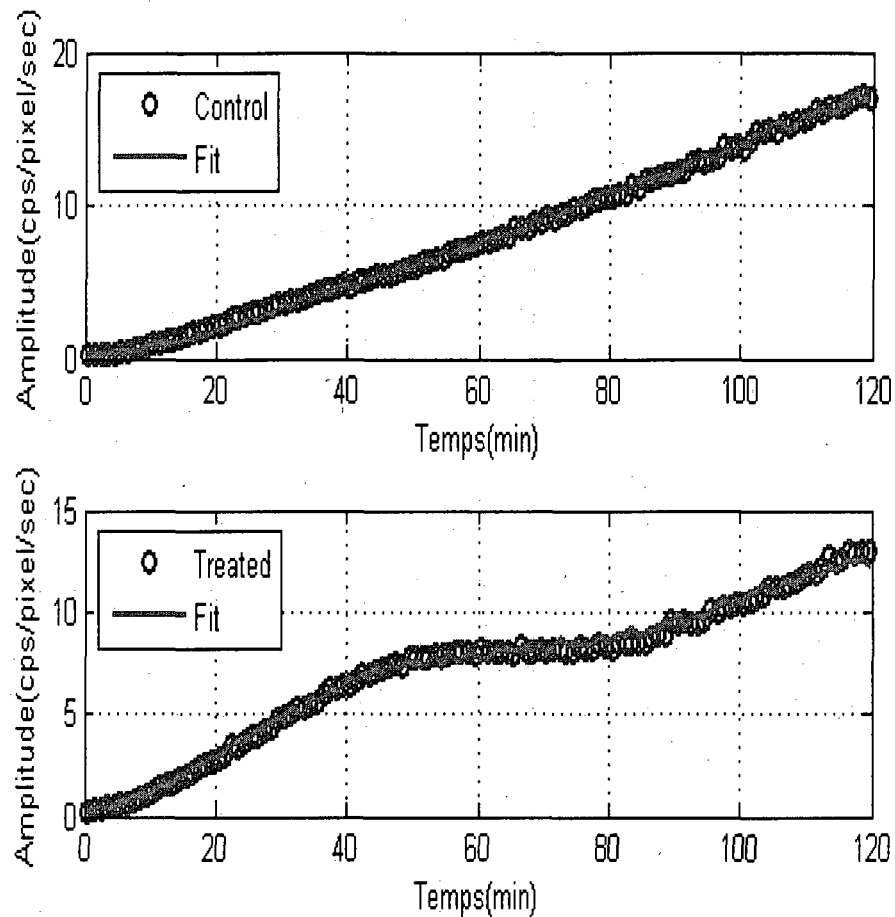


Fig. 8. FDG kinetic fit to control tumor (top) and treated (bottom) measured with AlPcS₄

V. Discussion and Conclusions

The photosensitizer ZnPcS₂ readily localizes in tumor cells after intravenous injection, while AlPcS₄ remains in the tumor vascular compartment [1]. PDT with ZnPcS₂ impairs mitochondrial and other intracellular membrane systems, resulting in direct tumor cell kill, whereas PDT with AlPcS₄ damages tumor blood vessels, interrupting the supply of oxygen and nutrients, resulting in indirect tumor cell death. The combination of tumor

treatment and dynamic PET imaging using continuous radiotracer injection to observe the tumor response to treatment in real time is a challenging task. The tumors, without necrosis, continuously accumulate FDG for their metabolism. Even with a continuous infusion during two hours, the time activity curve of the tumors continuously rises (Figs. 8 and 9). By fitting the tumor TACs with an appropriate kinetic model, the rate constants, the free FDG compartment and the metabolised FDG compartment could help to determine the action of the PS.

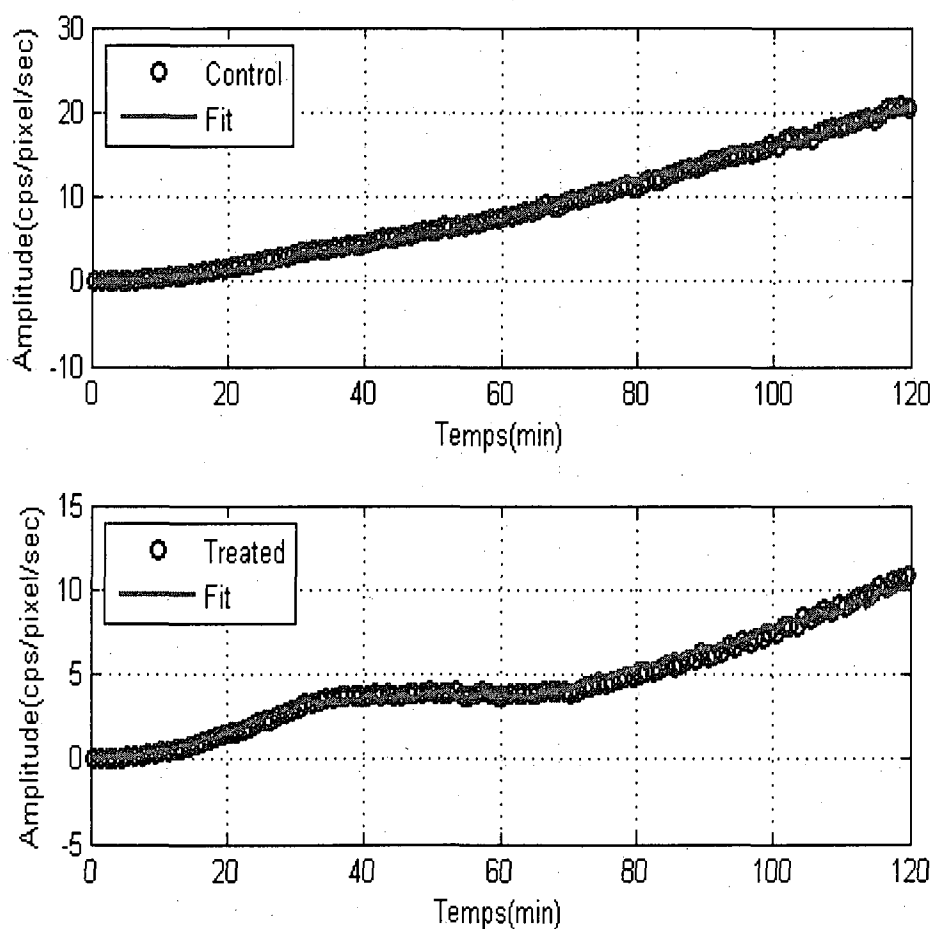


Fig. 9. FDG kinetic fit to control tumor (top) and treated (bottom) measured with ZnPcS_2 .

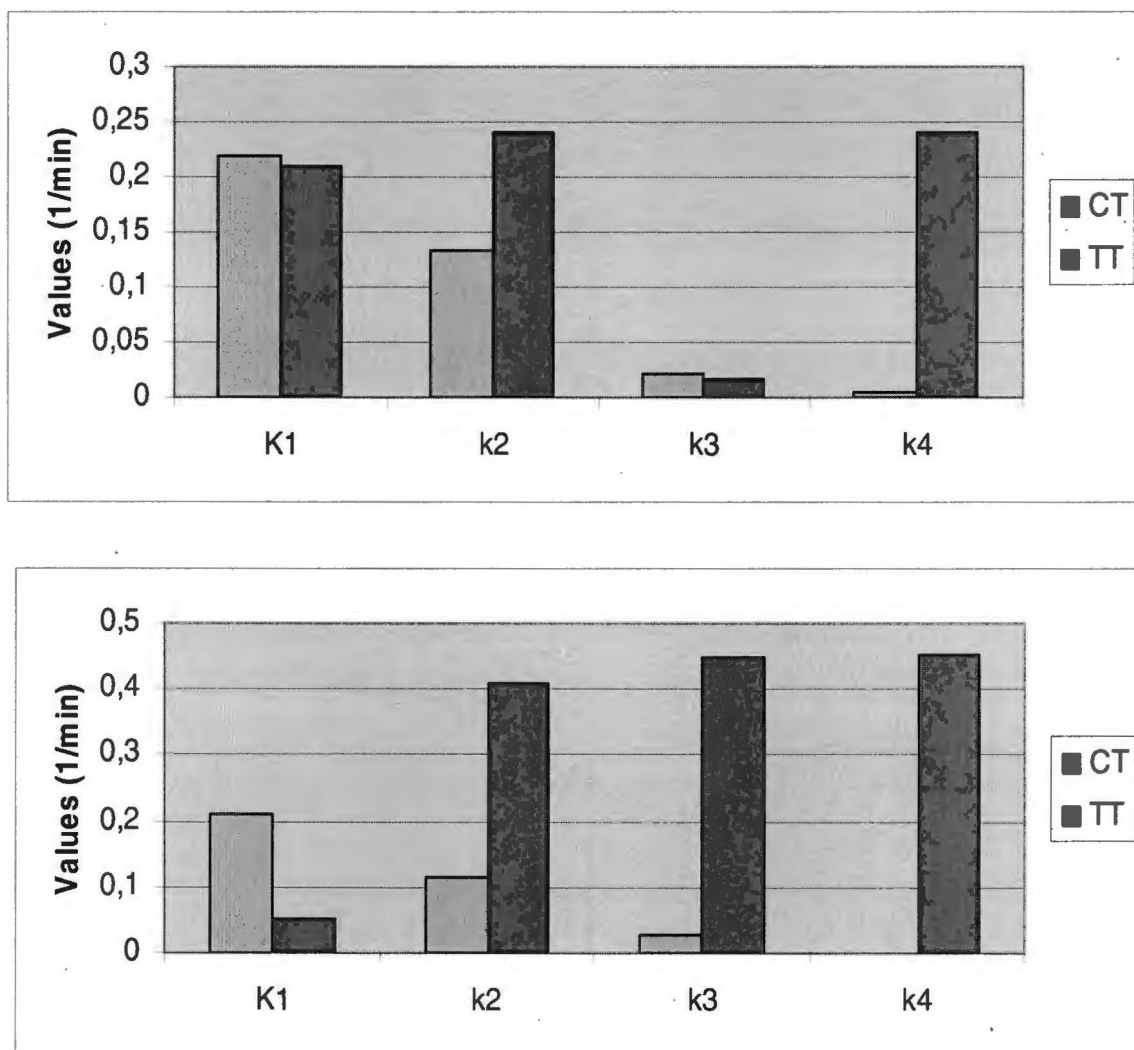


Fig. 10. Rate constants k_1 - k_4 in control and treated tumors with AlPcS₄ (top) (average $w_1=0.53$) and ZnPcS₂ (bottom) (average $w_1=0.58$). CT and TT are control and treated tumors.

To fit the tumor TACs, the input curves were extracted by means of factor analysis from ROIs drawn on the tumors, since the input curves derived from the heart did not allow the model to fit the data, because, a priori, the blood supply to the tumors varies during the illumination of the tumors. As a result, an input curve derived from the blood pool does not reflect the shape nor the amplitude of the blood supplied to the tumors. By

using the input curves defined with factor analysis, although the amplitude was not accurate, the model was able to nicely fit the data. Nevertheless, the rate constant values calculated here are only for comparison while using the same protocol of measurements and the same data analysis methods.

REFERENCES

- [1] W. S. Chan, N. Brasseur, C. La Madeleine, J. E. van Lier, "Evidence for different mechanisms of emt-6 tumor necrosis by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or Photofrin: tumor cell survival and blood flow," *Anticancer Res.*, 16:1887-1892, 1996.
- [2] W. S. Chan, N. Brasseur, C. La Madeleine, R. Ouellet, J. E. van Lier, "Efficacy and mechanism of aluminium phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours," *Eur J Cancer*, 33:1855-1859, 1997.
- [3] N. L. Oleinick, H. H. Evans, "The Photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiat Res.* 1998; 150(suppl):146-S156.
- [4] B. Krammer, "vascular effects of photodynamic therapy," *Anticancer Res.* 2001; 21; 4271-4277.
- [5] A. B. Uzdensky, V. M. Derkacheva, O. Y. Dergacheva, A. A. Zhavoronkova, "A single neuron response to photodynamic effect of various aluminum and zinc phthalocyanines," *Life Sciences* 68 (2000), 547-555.
- [6] D. Phillips, "The photochemistry of sensitizers for photodynamic therapy". *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 67, No. 1, pp. 117-126, 1995.
- [7] C. Milanesi, C. Zhou; R. Biolo, G. Jori, "Zn (II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumours. II. Studies on the mechanism of photosensitized tumour necrosis," *Br. J. Cancer.*, 61:846-850, 1990.
- [8] J. E. van Lier, J. D. Spikes, "The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines," *Ciba Found Symp.*, 146:17-32, 1989.
- [9] W. B. Henderson and V. H. Fingar, "Relationship of Tumor Hypoxia and Response to Photodynamic Treatment in a Experimental Mouse Tumor," *Cancer Res* 1987 47: 3110-3114.
- [10] V. Bérard, J. Rousseau, J. Cadorette, L. Hubert, M. Bentourkia, J. E. van Lier, R. Lecomte, "Dynamic Imaging of Transient Metabolic Processes by Small Animal Positron Emission Tomography for the Evaluation of PS in Photodynamic Therapy of Cancer," *J. Nucl. Med.*, 47:1119-1126, 2006.
- [11] P. D. Acton, C. Hou, M. P. Kung, K. Plössl, C. L. Keeney, H. F. Kung, "Occupancy of dopamine D2 receptors in the mouse brain measured using ultra-high resolution single photon emission tomography and [123 I]IBF," *Eur J Nucl Med.* 2002; 29:1507-1515.

- [12] K. Schmidt, G. Mies, L. Sokoloff, "Model of kinetic behavior of deoxyglucose in heterogeneous tissues in brain: a reinterpretation of the significance of parameters fitted to homogeneous tissue models," *J. Cereb Blood flow Metab* 1990; 11:10-24.
- [13] M. E. Phelps, S. C. Huang, E. J. Hoffman, C. Slin, L. Sokoloff, D. E. Kuhl, "Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-d-glucose: validation of method," *Ann Neurol.*, 6:371-88, 1979.
- [14] H. M. Wu, S. C. Huang, Y. Choi, C. K. Hoh and A. R. Hawkins, "A Modeling Method to Improve Quantitation of Fluorodeoxyglucose Uptake in Heterogeneous Tumor Tissue," *Journal of Nuclear Medicine*. Vol 36 (2) :297-306, 1995.
- [15] P. Boubacar, M Bentourkia, J. E van Lier, R. Lecomte, "Kinetic modeling of PET data and FDG continuous infusion in rat tumors simultaneously treated with PDT". NSS and MIC, 2007.
- [16] M. Bentourkia, D. Lapointe, V. Selivanov, I. Buvat, R. Lecomte, "Determination of Blood Curve and Tissue Uptake from Left Ventricle Using FADS in Rat FDG-PET Studies," *IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference, NSS-MIC Sessions*, M06-005; 1999.
- [17] M. Bentourkia, "Kinetic modeling of PET data without blood sampling," *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, vol. 52, no. 3, pp. 697-702, 2005.
- [18] R. Lecomte, J. Cadorette, S. Rodrigue, D. Lapointe, D. Rouleau, M. Bentourkia, R. Yao, and P. Msaki, "Initial results from the Sherbrooke avalanche photodiode positron tomograph," *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, vol. 43, pp. 1952-1957, 1996.

III DISCUSSION

En médecine nucléaire clinique, l'imagerie TEP est habituellement réalisée après un temps fixe suivant l'injection d'un radiotraceur. Par exemple, les scans au FDG sont exécutés environ une heure après son injection, temps auquel ce traceur a presque atteint un état d'équilibre, c'est-à-dire que l'on peut ignorer l'évolution temporelle de la fixation du FDG dans la tumeur (BUVAT *et al.*, 2007). À ce moment, la captation régionale représente adéquatement le niveau de métabolisme du glucose. L'imagerie dynamique, au cours de laquelle les changements dans la captation d'un radiotraceur sont mesurés dans le temps, fournit quant à elle beaucoup plus d'informations sur la physiologie sous-jacente d'un tissu et a habituellement lieu après l'injection du radiotraceur sous forme de bolus. Cette méthode d'injection est par contre limitante du fait que l'observation de changements sur une certaine période de temps devra être accompagnée d'injections additionnelles. Aussi, si ces changements sont transitoires ou trop rapides, la cinétique du traceur utilisé peut s'avérer être trop lente pour bien les étudier. En effet, la cinétique de captation du FDG étant relativement lente, une simple injection en bolus ne permet pas de mesurer instantanément le métabolisme du glucose. Alors dans le but de détecter des changements transitoires dans la captation d'un traceur, une infusion lente de ce dernier constitue la méthode de choix, puisque l'injection du traceur se fait de façon continue tout au long de l'imagerie. Des protocoles d'infusion en continu ont déjà été employés afin d'observer des changements transitoires dans le cadre d'études neurologiques où l'infusion lente d'un radio-ligand a permis d'étudier de façon dynamique les interactions

ayant lieu au niveau des sites de liaison des récepteurs (ACTON *et al.*, 2002; ENDRES et CARSON, 1998).

Ce mémoire, quant à lui, traite du potentiel d'utiliser la modélisation pharmacocinétique pour étudier les phénomènes transitoires métaboliques. Le modèle compartimental du FDG (PHELPS *et al.*, 1979) permet d'extraire les paramètres physiologiques tels le métabolisme du glucose ou la perfusion. L'imagerie TEP dynamique avec une infusion continue du radiotracer FDG permet ainsi l'évaluation en temps réel de la réponse tumorale à la thérapie photodynamique chez le rat. De façon plus spécifique, le mécanisme d'action de différents PS a été investigué en fonction des processus métaboliques transitoires observés durant et immédiatement après l'illumination (se référer à la section Présentation des travaux : Article 1).

L'utilisation de l'analyse factorielle pour extraire la courbe sanguine dans ce travail a été motivée par l'idée que l'illumination a affecté les courbes sanguines des tumeurs traitées. En effet si on considère le PS AlPcS₄, connu pour agir de façon indirecte sur la mort des cellules tumorales (FINGAR *et al.*, 1993; PENG *et al.*, 1990), nous avons supposé que la concentration du FDG dans la tumeur traitée, où la vascularisation doit avoir été endommagée, ne devrait pas avoir la même allure que dans la tumeur contrôle où la vascularisation est supposée intacte. Cela nous a effectivement permis d'obtenir des profils de captation dans le sang significativement différents, entre la tumeur traitée et la tumeur contrôle, nous permettant d'affirmer que la courbe sanguine devrait être extraite de la tumeur elle-même.

En outre, la TPD a occasionné tant pour le ZnPcS₂ que le AlPcS₄ une chute dans le taux de captation du FDG suivie d'une récupération partielle un certain temps après la fin de

l'illumination, mais avec des profils de réponse différents. L'analyse de ces courbes temps-activité dans l'article 1, notamment par l'ajout de facteurs de pondération caractérisant l'effet du traitement, a permis d'extraire plusieurs paramètres offrant la possibilité d'identifier divers processus métaboliques transitoires se déroulant dans les tumeurs pendant et tout de suite après le traitement et ainsi établir que le PS ZnPcS_2 entraîne la mort des cellules tumorales directement alors que le AlPcS_4 agit plutôt indirectement en affectant leur vascularisation. La pondération doit s'opérer sur les paramètres du modèle. Nos résultats semblent confirmer ce que d'autres groupes ont trouvé par des méthodes plus conventionnelles pour étudier les mécanismes d'action des PS en thérapie photodynamique. La référence à la notion de perturbation, dans cet article, met en évidence le caractère instable du système de la tumeur traitée. Le fait que cette perturbation soit caractérisée par une constante justifie qu'il n'est pas nécessaire de poursuivre le traitement pendant un temps aussi long que les 30 minutes du protocole, et que diminuer le temps d'illumination ne devrait pas avoir un impact négatif sur le traitement, à tout le moins au niveau de la réponse métabolique de la tumeur. D'autres études se font dans notre laboratoire pour voir l'effet de la dose de fluence et du fractionnement de la lumière sur l'efficacité du traitement.

Dans le deuxième article, nous avons introduit l'approche dite des deux populations. L'avantage de cette approche, c'est de mettre en relief la notion d'apoptose. En fait, les changements dans le métabolisme tumoral causés par la TPD sont compatibles avec l'existence de phénomènes d'apoptose, avec l'utilisation d'un PS comme le ZnPcS_2 causant des dommages cellulaires via un mécanisme d'action directe, ou bien de stase

vasculaire, avec un PS comme le AlPcS₄ causant des dommages indirectement via la destruction des vaisseaux sanguins irriguant les cellules tumorales.

En effet, nous avons observé que le processus d'apoptose serait potentiellement impliqué dans la reprise de captation rapide et presque totale du FDG observée suite à la TPD avec le ZnPcS₂. Cela est corroboré par nos courbes d'inactivation, qui montrent un certain regain dans la consommation du FDG après l'arrêt de l'illumination. Toutefois, afin de vérifier en temps réel s'il s'agit bel et bien du début d'un phénomène apoptotique, il faudrait disposer d'un traceur permettant de détecter la présence d'apoptose en l'injectant de façon continue tout au long de l'imagerie et de l'illumination, comme nous l'avons fait avec le FDG. Récemment, une nouvelle technique de préciblage à l'annexine V a été développée dans notre laboratoire afin de détecter les processus apoptotiques chez la souris, mais le procédé de préciblage ne se prête pas à un suivi dynamique et ne peut être observé que quelques heures après l'application de la thérapie photodynamique (CAUCHON *et al.*, 2007).

Toutes ces précautions ne sauraient annuler la principale difficulté de cette approche qui réside dans la définition de la deuxième population, étant entendu que la première population est celle des cellules tumorales.

Pour ces deux approches, nous avons pensé qu'une étude des changements dans la perfusion tumorale induits par la TPD aurait l'avantage de nous informer sur l'état de la vascularisation tumorale, mais surtout fixerait un des paramètres et rendrait tout travail de modélisation plus facile. Il faut préciser que la mesure de perfusion a déjà fait l'objet de tentatives avec le [⁶⁴Cu]-PTSM et le [¹³N]-NH₃ [BÉRARD *et al.*, 2005]. Pour l'ammoniac, la courte demi-vie du radiotraceur a constitué la principale limitation dans le

cas qui nous intéresse. Quant au PTSM, c'est le manque de connaissance de la pharmacocinétique de ce radio traceur qui a constitué la principale limitation.

C'est donc, compte tenu de tout ce qui précède que nous avons entamé deux avenues pour l'étude de la perfusion:

- La première utilise le ^{11}C -acétate et reprend le même protocole que pour le FDG mais avec un temps d'acquisition et d'illumination plus courts, à cause de la demi-vie plus courte du ^{11}C -acétate. Cette étude avec l'acétate, si elle aboutissait validerait son utilisation pour l'étude de la perfusion tumorale en général. En effet, il est pour l'instant avéré que l'acétate n'est valide, pour l'étude de la perfusion, que dans le cas de tumeur de la prostate. Notre hypothèse nécessiterait donc une validation préalable dans tout autre type de tumeurs.
- La deuxième avenue utiliserait l'IRM pour étudier la perfusion tumorale. L'idée, c'est de pouvoir démontrer l'effet du traitement sur la perfusion tumorale et ainsi pouvoir fixer le paramètre correspondant dans le modèle du FDG. En effet, à partir des images obtenues en IRM, on utilisera le modèle pharmacocinétique avec région de référence (YANKEELOV *et al.*, 2005) pour générer une composante sanguine et ainsi on va utiliser cette composante sanguine dans le modèle pharmacocinétique du FDG. On espère, ainsi, montrer l'équivalence des paramètres, k_{trans} et k_{trans}/v_e , pour l'IRM, versus K_1 et k_2 , pour le FDG, respectivement.

IV CONCLUSIONS

Étant donné que la thérapie photodynamique engendre rapidement des effets au niveau des tumeurs traitées, il a été suggéré que l'imagerie TEP pourrait être un outil quantitatif dans l'étude de la réponse tumorale, tôt suite au traitement. L'imagerie TEP avec le FDG s'est effectivement avérée être une méthode prometteuse dans l'étude des effets de la thérapie photodynamique du cancer *in vivo*, soit dans l'évaluation de l'efficacité d'un PS ou dans la détermination de son mécanisme d'action. Afin de mieux comprendre les processus biologiques transitoires impliqués dans la destruction des cellules tumorales, c'est-à-dire les processus survenant durant et immédiatement après l'illumination, nous avons développé une nouvelle approche de modélisation qui consiste à pondérer les paramètres du modèle pour caractériser l'effet du traitement. Le but poursuivi est d'évaluer en temps réel les processus métaboliques transitoires observés durant et immédiatement après l'illumination, à travers le mécanisme d'action de différents PS.

Cette approche de pondération a effectivement permis de mettre en évidence des différences importantes au niveau des paramètres avant, pendant et après le traitement. On a essayé de faire le rapprochement entre ces paramètres et les profils de captation des tumeurs reflétant l'existence de processus transitoires distincts selon le PS utilisé, procurant une façon rapide de faire la distinction entre un mécanisme de destruction directe ou indirecte des cellules tumorales. Tel que discuté dans le cadre de l'article 1, les deux différentes classes de PS utilisées ont effectivement permis de générer des

paramètres distincts. Il a été relativement aisé de faire un rapprochement entre les paramètres générés par le modèle et les mécanismes d'action des PS sur la tumeur. Ainsi pour la drogue amphiphile, ZnPcS_2 , le compartiment métabolisé aurait tendance, après le traitement, à se vider dans le compartiment libre. Alors que pour la drogue hydrophile, AlPcS_4 , c'est plutôt le compartiment libre qui aurait tendance à se vider après le traitement. Ces résultats ont permis de conclure, en accord avec des études plus conventionnelles réalisées antérieurement (FINGAR *et al.*, 1993; PENG *et al.*, 1990, BÉRARD *et al.*, 2006), que la TPD faite avec le ZnPcS_2 induit plutôt directement la mort cellulaire, alors que l'emploi du AlPcS_4 affecte en premier lieu le système vasculaire de la tumeur amenant une mort cellulaire indirecte par la suite. Même si cette approche par pondération est difficile à valider à cause de la perturbation induite qui en résulte sur des systèmes stables, les différences majeures entre les paramètres générés caractérisant ainsi les processus métaboliques transitoires observés, révélés par les changements dans le taux de captation du FDG nous donnent la certitude de l'existence de mécanismes d'action distincts et ainsi de la justesse qu'il y aurait à approfondir cette approche.

En plus d'inclure la notion de région de référence, le modèle des deux populations, tel que discuté dans le cadre de l'article 2, a quant à lui, d'abord permis de relier les courbes d'inactivation, dans leur partie correspondante au post-traitement, et les mécanismes d'action des PS. L'explication du regain de captation résultant du processus d'apoptose paraît être une hypothèse scientifiquement plausible.

Le modèle des deux populations, contrairement à l'approche par pondération, a pu être validé par l'application du modèle standard du FDG sur les tumeurs contrôles. Mais les

ajustements obtenus paraissent moins bons que ceux que nous donnaient les pondérations. Cela constitue la première question soulevée par ce modèle. Le modèle de survie cellulaire, dérivé des courbes observées en radiothérapie, serait probablement en cause, s'avérant incomplet ou inadéquat pour représenter la survie cellulaire sous thérapie photodynamique. En effet, il est peut-être hasardeux de vouloir négliger le regain observé dans le cas des tumeurs traitées avec du ZnPcS_2 . Mais que ça soit pendant ou après le traitement, il est difficile en l'absence d'une donnée expérimentale d'affirmer que notre hypothèse est inexacte. Il s'agit d'un aspect qui mériterait certainement d'être exploré pour démontrer la pertinence et la validité de cette approche.

V

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de recherche, le Dr Roger Lecomte et le Dr M'hamed Bentourkia, de m'avoir donné la chance de poursuivre mon cheminement scientifique dans un milieu de recherche stimulant. Le projet de maîtrise qu'ils m'ont confié m'a beaucoup tenu à cœur et ce mémoire en est le résultat.

Un merci particulier aux Drs Benoit Paquette, Johan Van Lier et Martin Lepage pour leur grande disponibilité à mon égard.

Un merci particulier, aussi, à Otman Sarrhini pour ses multiples conseils et les longues discussions pendant les repas.

Merci à tous les membres du Département de Médecine Nucléaire et Radiobiologie, spécialement à tous ceux celles m'ayant apporté de l'aide ou véhiculé des mots d'encouragements pendant mes études graduées.

Je tiens à remercier les membres du Jury, soient le Dr Roger Lecomte, Dr M'hamed Bentourkia, Dr Martin Lepage et Dr Layachi Bentabet, d'avoir aimablement accepté d'évaluer ce travail.

Une grande reconnaissance et un grand merci à ma mère, à mon épouse, Nayé, et à mes frères.

Enfin, je dédie ce travail à mes enfants, Nadia et Mahamadou.

Paté

VI BIBLIOGRAPHIE

Abe Y., Matsuzawa T., Fujiwara T., *et al.* Assessment of radiotherapeutic effects on experimental tumors using ^{18}F -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Eur J Nucl Med.* 1986; 12:325-328.

Aboagye E.O., Price P.M. Use of positron emission tomography in anticancer drug development. *Invest New Drugs.* 2003; 21:169-181.

Ali, H., Langlois R., Wagner J.R., Brasseur N., Paquette B., Van Lier J.E. Biological activities of phthalocyanines--X. Syntheses and analyses of sulfonated phthalocyanines. *Photochem Photobiol.* 1988;47:713-717.

Allen C.M., Sharman W.M., Van Lier J.E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *J Porph Phthal.* 2001; 5:161-169.

Babich J.W., Cherry S.R., Carnochan P., McGuire J., Sharma H. An evaluation of Cu-64 pyruvaldehyde bis (methylthiosemicarbazone) (PTSM) for the measurement of tissue perfusion. *J Nucl Med.* 1989; 30:1756.

Barthel H., Cleij M.C., Collingridge D.R., *et al.* 3'-deoxy-3'-[^{18}F]fluorothymidine as a new marker for monitoring tumor response to antiproliferative therapy in vivo with positron emission tomography. *Cancer Res.* 2003;63:3791-3798.

Beanlands R.S., Muzik O., Mintun M., *et al.* The kinetics of copper-62-PTSM in the normal human heart. *J Nucl Med.* 1992; 33:684-690.

Ben-Hur E., Heldman E., Crane S.W., Rosenthal I. Release of clotting factors from photosensitized endothelial cells: A possible trigger for blood vessel occlusion by photodynamic therapy. *FEBS Lett.* 1988; 236:105-108.

Blankenberg F.G. Recent advances in the imaging of programmed cell death. *Curr Pharm Des.* 2004; 10:1457-1467.

Bonneau S.: Dynamique d'interaction de tetrapyrroles avec des membranes et des lipoprotéines: Conséquences sur la localisation cellulaire. Thèse de doctorat de l'université Paris 6 – Pierre et Marie Curie, 2007

Bonnett R., White R.D., Winfield U.J. and Berenbaum M.C. (1989) - Hydroporphyrins of the meso-tetra (hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour PS. *Biochem J*, 261 (1): 277-80.

Boyle R.W., Paquette B., Van Lier J.E. Biological activities of phthalocyanines. XIV. Effect of hydrophobic phthalimidomethyl groups on the in vivo phototoxicity and

mechanism of photodynamic action of sulphonated aluminium phthalocyanines. *Br J Cancer*. 1992;65:813-817.

Brasseur N., Lewis K, Rousseau J, Van Lier J.E. Measurement of tumor vascular damage in mice with 99mTc-MIBI following photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 1996; 64:702-706.

Carnochan P., Brooks R. Radiolabelled 5'-iodo-2'-deoxyuridine: A promising alternative to [¹⁸F]-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose for PET studies of early response to anticancer treatment. *Nucl Med Biol*. 1999; 26:667-672.

Carruth J.A. (1998) - Clinical applications of photodynamic therapy. *Int J Clin Pract*, 52 (1): 39-42.

Cauchon N., Langlois R, Rousseau J.A., Tessier G., Cadorette J., Lecomte R., Hunting J.D., Pavan A.R., Zeisler K. S. & Van Lier J.E. PET imaging of apoptosis with 64Cu-labeled streptavidin following pretargeting of phosphatidylserine with biotinylated annexin-V. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* Vol. 34, No. 2, February 2007.

Chan W.S., Brasseur N., LA Madeleine C., Van Lier J.E. Evidence for different mechanisms of EMT-6 tumor necrosis by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or photofrin: Tumor cell survival and blood flow. *Anticancer Res*. 1996; 16:1887-1892.

Chan W.S., Brasseur N., LA Madeleine C., Ouellet R., Van Lier J.E. Efficacy and mechanism of aluminium phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours. *Eur J Cancer*. 1997;33:1855-1859.

Chaiken L., Rege S., Hoh C., *et al.* Positron emission tomography with fluorodeoxyglucose to evaluate tumor response and control after radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1993; 27:455-464.

Chatziioannou A.F. PET scanners dedicated to molecular imaging of small animal models. *Mol Imaging Biol*. 2002; 4:47-63.

Cheli R., Addis F., Mortellaro C.M., Fonda D., Cubeddu R. Photodynamic therapy of spontaneous animal tumors using the active component of hematoporphyrin derivative (DHE) as photosensitizing drug: Clinical results. *Cancer Lett*. 1987;38:101-105.

Cherry S.R., Gambhir S.S. Use of positron emission tomography in animal research. *ILAR J*. 2001; 42:219-232.

Cremer R.J., Perryman P.W. and Richards D.H. (1958) - Influence of light on the hyperbilirubinaemia of infants. *Lancet*, i: 1094-1097.

- Detty M.R., Gibson S.L., Wagner S.J. Current clinical and preclinical PS for use in photodynamic therapy. *J Med Chem.* 2004; 47:3897-3915
- Dougherty T.J., Henderson B.W., Schwartz S., Winkelman J.W. and Lipson R.L. (1992) - Historical perspective. Photodynamic Therapy. Marcel Dekker, New York: 1-15.
- Dougherty T.J. (1993) - Photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 58 (6): 895-900.
- Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J. and Peng Q. (1998) - Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*, 90 (12): 889-905.
- Drabkin D.L. (1978) - Selected landmarks in the history of porphyrins and their biologically functional derivatives. The porphyrins. Academic Press, New York: 31-84.
- Elmets C.A. and Bowen K.D. (1986) - Immunological suppression in mice treated with hematoporphyrin derivative photoradiation. *Cancer Res*, 46 (4 Pt 1): 1608-11.
- Eustache F., Desgranges B., Petit-Taboue M.C., et al. Transient global amnesia: Implicit/explicit memory dissociation and PET assessment of brain perfusion and oxygen metabolism in the acute stage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997; 63:357-367.
- Fingar V.H., Taber S.W., Haydon P.S., Harrison L.T., Kempf S.J. and Wieman T.J. (2000) - Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors: a view and comparison of effect in pre-clinical and clinical models at the University of Louisville. *In Vivo*, 14 (1): 93-100.
- Finsen N.F. (1901) - Phototherapy. London:
- Foote C.S. (1984) - Mechanisms of photooxygenation. *Prog Clin Biol Res*, 170: 3-18.
- Girotti A.W. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem Photobiol*. 1990; 51:497-509.
- Green M.A., Mathias C.J., Welch M.J., et al. Copper-62-labeled pyruvaldehyde bis(N4-methylthiosemicarbazone)copper(II): Synthesis and evaluation as a positron emission tomography tracer for cerebral and myocardial perfusion. *J Nucl Med*. 1990;31:1989-1996.
- Gronroos T., Bentzen L., Marjamaki P., et al. Comparison of the biodistribution of two hypoxia markers [^{18}F]FETNIM and [^{18}F]FMISO in an experimental mammary carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004; 31:513-520.
- Gunn R.N., Gunn R.S. and Cunningham J.V. Journal cerebral Blood Flow and metabolism. 21:635-652, 2001.

- Hawkins R.A., Phelps M.E. PET in clinical oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 1988; 7:119-142.
- Henderson B.W., Waldow S.M., Mang T.S., Potter W.R., Malone P.B., Dougherty T.J. Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy. *Cancer Res.* 1985; 45:572-576.
- Henderson B.W., Fingar V.H. Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. *Cancer Res.* 1987; 47:3110-3114.
- Henderson B.W. and Fingar V.H. (1987) - Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. *Cancer Res.* 47 (12): 3110-4
- Henderson B.W. and Dougherty T.J. (1992) - How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* 55 (1): 145-57.
- Herschman H.R. Micro-PET imaging and small animal models of disease. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15:378-384.
- Hongying Y., Fuyuan W. and Zhiyi Z. (1999) - Photobleaching of chlorins in homogeneous and heterogeneous media. *Dyes and Pigments*, 43: 109-117.
- Hsia-Ming W., Sung-Cheng H., Yong C., Carl K. H., Randall A. H.,
A modeling Method to Improve Quantitation of Fluorodeoxyglucose Uptake in heterogeneous Tumor Tissue. *J Nucl Med.* Vol. 36, No.2; 1995.
- Buvat I.: Les limites du SUV. *Médecine Nucléaire* 31 (2007) 165-172
- Iyer M, Barrio JR, Namavari M, *et al.* 18-[¹⁸F]fluoropenciclovir: An improved reporter probe for imaging HSV1-tk reporter gene expression in vivo using PET. *J Nucl Med.* 2001; 42:96-105.
- John E.K., Green M.A. Structure-activity relationships for metal-labeled blood flow tracers: Comparison of keto aldehyde bis(thiosemicarbazonato)copper(II) derivatives. *J Med Chem.* 1990; 33:1764-1770.
- Jori G., Reddi E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting PS. *Int J Biochem.* 1993; 25:1369-1375.
- Jori G. In vivo transport and pharmacokinetic behavior of tumour PS. *Ciba Found Symp.* 1989; 146:78-86; discussion 86-94.
- Jung, R.T., Davie, M., Hunter, J.O. and Chalmers, T.M. (1978) - Ultraviolet light: an effective treatment of osteomalacia in malabsorption. *Br Med J*, 1 (6128): 1668-9.

Kessel, D. and Dougherty, T.J. (1999) - Agents used in photodynamic therapy. *Rev. Contemp. Pharmacother.*, 10: 19-24.

Kessel, D., Luo, Y., Deng, Y. and Chang, C.K. (1997) - The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 65 (3): 422-6.

Kessel, D., Luo, Y., Mathieu, P. and Reiners, J.J., Jr. (2000) - Determinants of the apoptotic response to lysosomal photodamage. *Photochem Photobiol*, 71 (2): 196-200.

Kessel D., Thompson P., Saatio K., Nantwi K.D. Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine. *Photochem Photobiol*. 1987; 45:787-790.

Kongshaug M. Distribution of tetrapyrrole PS among human plasma proteins. *Int J Biochem*. 1992; 24:1239-1265.

Korbelik, M. (1996) - Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg*, 14 (5): 329-34.

Korbelik M., Krosi G. Enhanced macrophage cytotoxicity against tumor cells treated with photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 1994; 60:497-502.

Krammer B. Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Res*. 2001; 21:4271-4277.

Krosi G., Korbelik M., Dougherty G.J. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *Br J Cancer*. 1995;71:549-555.

Lapointe D., Brasseur N., Cadorette J., *et al.* High-resolution PET imaging for in vivo monitoring of tumor response after photodynamic therapy in mice. *J Nucl Med*. 1999;40:876-882.

Lecomte R., Bentourkia M., Bénard F. Tomographie d'émission par positrons en oncologie. *La Physique au Canada*. 2002;58:109-117.

Lewis J., Laforest R., Buettner T., *et al.* Copper-64-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone): An agent for radiotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:1206-1211.

MacRobert A.J., Bown S.G. and Phillips D. (1989) - What are the ideal photoproperties for a sensitizer? *Ciba Found Symp*, 146: 4-12; discussion 12-16.

Macdonald I.J., Dougherty T.J. Basic principles of photodynamic therapy. *J Porph Phthal*. 2001; 5:105-129.

Margaron P., Madarnas P., Ouellet R., Van Lier J.E. Biological activities of phthalocyanines. XVII Histopathologic evidence for different mechanisms of EMT-6 tumor necrosis induced by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or photofrin. *Anticancer Res.* 1996; 16:613-620.

Mathias C.J., Welch M.J., Raichle M.E., *et al.* Evaluation of a potential generator-produced PET tracer for cerebral perfusion imaging: Single-pass cerebral extraction measurements and imaging with radiolabeled Cu-PTSM. *J Nucl Med.* 1990;31:351-359.

Mathias C.J., Welch M.J., Perry D.J., *et al.* Investigation of copper-PTSM as a PET tracer for tumor blood flow. *Int J Rad Appl Instrum B.* 1991; 18:807-811.

Maziere J.C., Morliere P., Santus R. The role of the low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of lipophilic PS in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B.* 1991; 8:351-360.

Meikle S., Matthews J.C., Cunnigham V.J., Bailey L.D., Livieratos L., Jones T. and Price P. Parametric image reconstruction using spectral analysis of PET projection data. *Phys. Med. Biol.* 43;651-666, 1998.

Melnikova, V.O., Bezdetnaya, L.N., Potapenko, A.Y. and Guillemin, F. (1999) - Photodynamic properties of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in human tumor cells. *Radiat Res*, 152 (4): 428-35.

Milanesi C., Zhou C., Biolo R., Jori G. Zn(II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumours. II. Studies on the mechanism of photosensitised tumour necrosis. *Br J Cancer.* 1990; 61:846-850.

Moser, J.G. (1998) - Definition and general properties of 2nd and 3rd generation photosensitizer. Photodynamic tumor therapy. 2nd and 3rd generation PS. Harwood Academic Publisher, Amsterdam, Netherland: 3-7.

Moan J., Peng Q. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res.* 2003; 23:3591-3600.

Moore J.V., Waller M.L., Zhao S., *et al.* Feasibility of imaging photodynamic injury to tumours by high-resolution positron emission tomography. *Eur J Nucl Med.* 1998;25:1248-1254.

Moore J.V., West C.M., Whitehurst C. The biology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol.* 1997; 42:913-935.

Myers R. The biological application of small animal PET imaging. *Nucl Med Biol.* 2001; 28:585-593.

Ochsner M. (1997) - Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B*, 39 (1): 1-18.

Oleinick N.L. and Evans H.H. (1998) - The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiat Res*, 150 (5 Suppl): S146-56.

Oleinick N.L., Evans H.H. The photobiology of photodynamic therapy: Cellular targets and mechanisms. *Radiat Res*. 1998; 150:S146-56.

Parrish J.A., Fitzpatrick T.B., Tanenbaum L. and Pathak M.A. (1974) - Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *N Engl J Med*, 291 (23): 1207-11.

Peaston A.E., Leach M.W., Higgins R.J. Photodynamic therapy for nasal and aural squamous cell carcinoma in cats. *J Am Vet Med Assoc*. 1993; 202:1261-1265.

Peng Q., Moan J., Nesland J.M., Rimington C. Aluminum phthalocyanines with asymmetrical lower sulfonation and with symmetrical higher sulfonation: A comparison of localizing and photosensitizing mechanism in human tumor LOX xenografts. *Int J Cancer*. 1990; 46:719-726.

Peng Q., Moan J. Correlation of distribution of sulphonated aluminium phthalocyanines with their photodynamic effect in tumour and skin of mice bearing CaD2 mammary carcinoma. *Br J Cancer*. 1995; 72:565-574.

Peng Q., Moan J., Farrants G., Danielsen H.E., Rimington C. Localization of potent PS in human tumor LOX by means of laser scanning microscopy. *Cancer Lett*. 1991; 58:17-27.

Phelps M.E., Huang S.C., Hoffman E.J., Selin C., Sokoloff L., Kuhl D.E. Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-d-glucose: validation of method. *Annals of neurology*, 6(5):371-388,1979.

Phelps M.E. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:9226-9233.

Rabb O. (1900) - On the effect of fluorescent substances on infusoria. *Z. Biol*, 39: 524-546.

Ricchelli F. (1995) - Photophysical properties of porphyrins in biological membranes. *J Photochem Photobiol B*, 29 (2-3): 109-18.

Rigo P., Paulus P., Kaschten B.J., et al. Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *Eur J Nucl Med*. 1996; 23:1641-1674.

Rodgers M.A. (1993) - Reflections on type I photodynamic damage. *J Photochem Photobiol B*, 18 (2-3): 296-8.

Rosenthal I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol.* 1991; 53:859-870.

Saha G.B., Macintyre W.J., Go R.T. Radiopharmaceuticals for brain imaging. *Semin Nucl Med.* 1994; 24:324-349.

Shelton M.E., Green M.A., Mathias C.J., Welch M.J., Bergmann S.R. Assessment of regional myocardial and renal blood flow with copper-PTSM and positron emission tomography. *Circulation.* 1990; 82:990-997.

Shelton ME, Green MA, Mathias CJ, Welch MJ, Bergmann SR. Kinetics of copper-PTSM in isolated hearts: A novel tracer for measuring blood flow with positron emission tomography. *J Nucl Med.* 1989; 30:1843-1847.

Slates R., Cherry S., Boutefnouchet A., Shao Y., Dahlbom M., Farahani K. Design of a small animal MR compatible PET scanner. 1998 IEEE Medical Imaging Conference; 12-14 novembre 1998; Toronto, Canada; IEEE 1999; 46:565-570.

Smith T.A. FDG uptake, tumour characteristics and response to therapy: A review. *Nucl Med Commun.* 1998; 19:97-105.

Sobolev A.S., Jans D.A. and Rosenkranz A.A. (2000) - Targeted intracellular delivery of PS. *Prog Biophys Mol Biol*, 73 (1): 51-90.

Sugiyama M., Sakahara H., Sato K., *et al.* Evaluation of 3'-deoxy-3'-¹⁸F-fluorothymidine for monitoring tumor response to radiotherapy and photodynamic therapy in mice. *J Nucl Med.* 2004; 45:1754-1758.

Sundaresan G., Yazaki P.J., Shively J.E., *et al.* ¹²⁴I-labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice. *J Nucl Med.* 2003; 44:1962-1969.

Tatsumi M., Nakamoto Y., Traughber B., Marshall L.T., Geschwind J.F., Wahl R.L. Initial experience in small animal tumor imaging with a clinical positron emission tomography/computed tomography scanner using 2-[F-18]fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Cancer Res.* 2003; 63:6252-6257.

Townsend D.W., Beyer T., Kinahan P.E., *et al.* The SMART scanner: A combined PET/CT tomograph for clinical oncology. 1998 IEEE Nuclear Science Symposium Conference; 8-14 novembre 1998; Toronto, Canada; IEEE 1998;2:1170-1174.

Von Tappeiner H. (1900) - On the action of fluorescent substances on infusoria according to the research of O. Raab. *Münch Med Wochenschr*, 47: 5-7.

Van Lier J.E., Spikes J.D. The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines. *Ciba Found Symp.* 1989;146:17-26; discussion 26-32.

Von Tappeiner, H. and Jesionek, A. (1903) - Therapeutic experiments with fluorescent substances. *Münch Med Wochenschr*, 47: 2042-2044.

Wahl R.L., Henry C.A., Ethier S.P. Serum glucose: Effects on tumor and normal tissue accumulation of 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose in rodents with mammary carcinoma. *Radiology*. 1992;183:643-647.

Wahl R.L., Zasadny K., Koeppe R.A., *et al.* Initial evaluation of Cu-62 PTSM as a tumor blood-flow agent in man - Comparison studies with O-15 water. *J Nucl Med*. 1993;34:224-225.

Wallhaus T.R., Lacy J., Whang J., Green M.A., Nickles R.J., Stone C.K. Human biodistribution and dosimetry of the PET perfusion agent copper-62-PTSM. *J Nucl Med*. 1998;39:1958-1964.

Wallhaus T.R., Lacy J., Stewart R., *et al.* Copper-62-pyruvaldehyde bis(N-methylthiosemicarbazone) PET imaging in the detection of coronary artery disease in humans. *J Nucl Cardiol*. 2001;8:67-74.

Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123:309-314.

Weber W.A., Schwaiger M., Avril N. Quantitative assessment of tumor metabolism using FDG-PET imaging. *Nucl Med Biol*. 2000;27:683-687.

Weber G. Carbohydrate metabolism in cancer cells and the molecular correlation concept. *Naturwissenschaften*. 1968;55:418-429.

Weissleder R., Mahmood U. Molecular imaging. *Radiology*. 2001;219:316-333.

Wu J.C., Inubushi M., Sundaresan G., Schelbert H.R., Gambhir S.S. Positron emission tomography imaging of cardiac reporter gene expression in living rats. *Circulation*. 2002;106:180-183.

Xiangsong Z., Changhong L., Weian C., Dong Z. PET imaging of cerebral astrocytoma with ¹³N-ammonia. *J Neurooncol*. 2006;78:145-151.

Yamamoto N., Hooper J.K., Yamamoto N., Yamamoto S. Tumoricidal capacities of macrophages photodynamically activated with hematoporphyrin derivative. *Photochem Photobiol*. 1992;56:245-250.

Yoshioka T., Takahashi H., Oikawa H., *et al.* Influence of chemotherapy on FDG uptake by human cancer xenografts in nude mice. *J Nucl Med*. 1997;38:714-717.

Zhou C.N. Mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 1989;3:299-318.